



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**JUAN DE SÁ RORIZ CAMINHA**

**AVALIAÇÃO DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL SOBRE OS PARÂMETROS  
INFLAMATÓRIOS, ESTRESSE OXIDATIVO E DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS E  
MONOAMINAS NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J JOVENS**

**FORTALEZA**

**2020**

**JUAN DE SÁ RORIZ CAMINHA**

**AVALIAÇÃO DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL SOBRE OS PARÂMETROS  
INFLAMATÓRIOS, ESTRESSE OXIDATIVO E DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS E  
MONOAMINAS NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J JOVENS**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Médicas.

Área de concentração: Patogênese das Doenças Imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C191a Caminha, Juan de Sá Roriz.  
Avaliação da intoxicação mercurial sobre os parâmetros inflamatórios, Estresse oxidativo e dosagem de aminoácidos e monoaminas no hipocampo de camundongos C57BL/6J jovens / Juan de Sá Roriz  
Caminha. – 2020.  
78 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
1. Metilmercúrio. 2. Hipocampo. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação . 5. Neurotransmissores. I. Título.  
CDD 610
-

**JUAN DE SÁ RORIZ CAMINHA**

**AVALIAÇÃO DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL SOBRE OS PARÂMETROS  
INFLAMATÓRIOS, ESTRESSE OXIDATIVO E DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS E  
MONOAMINAS NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J JOVENS**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Médicas.

Área de concentração: Patogênese das Doenças Imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Carlos Campos Câmara  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

A Deus,

Aos meus pais, Robério Caminha Gerônimo e  
Suêrda Maria de Sá Roriz Matos,

À minha noiva, Fátima Virgínia Gama Justi

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, pela recepção, acompanhamento, ensinamentos e orientação dos projetos concluídos no Laboratório da Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos (LABICONTE).

Aos amigos que fiz no ambiente científico antes e durante a pós-graduação, Marcos Aurélio de Sousa Lima, Tiago Santos Mendes, Daniel Vieira Pinto, Thiago Menezes Araújo Leite Sales, Cecília Mendes Moraes de Carvalho, Carlos Eduardo da Silva Monteiro, Álvaro Xavier Franco, Kaira Emanuella Sales Teixeira, Patrícia da Silva Pantoja, Fabrícia da Cunha Jácome Marques, Samara Rodrigues Bonfim Damasceno, Priscilla Fernanda Campos Justino, Lucas Antônio Duarte Nicolau, Renan Oliveira Silva, Humberto Barbosa da Costa Filho, Wallacy Ramon Pinheiro da Rocha, Gabriella Araújo Matos, Cristhyane Costa Aquino, Claudiane Carvalho Bessa, Ronaldo Pereira Dias, Robson Salviano de Matos, Cássia Rodrigues Roque, André Penha Aguiar, Jefferson dos Santos Lopes, Cláudia Maria Ribeiro Matheus, José Amadeus.

Ao Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo vinculado ao Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), que viabilizou a conclusão do projeto.

A Profa. Dra. Jaqueline Alvarez Leite, do Laboratório de Bioquímica Nutricional da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que contribuiu de forma direta para a manutenção dessa pesquisa.

A Prof. Dra. Flávia Almeida Santos e ao seu aluno Paulo Iury Gomes Nunes, e aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais (LPN) que muito contribuíram para análises dos resultados.

A Profa. Dra. Geanne Andrade Matos, e ao seu aluno Francisco Arnaldo Viana Lima do Laboratório de Neurociências e Comportamento, que muito contribuíram para a obtenção dos resultados.

Aos Professores Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, e Dr. Carlos Campos Câmara, por aceitarem participar da Banca examinadora e pela colaboração com o trabalho.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos por ter me dado a oportunidade de vivenciar o início do meu caminho na pós-graduação em seu Laboratório (Laboratório Escola Luiz Capelo – LELC), assim como aos seus técnicos Haroldo e Márcia Netto Magalhães Alves, pela ajuda no dia-a-dia.

Ao Professor Dr. Pedro Marcos Gomes Soares pela oportunidade de ter vivenciado

a iniciação científica no Laboratório De Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG), assim como permitir a utilização do ambiente durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, coordenadores e professores pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que permitiu a realização dessa pesquisa.

“Certamente, ele tomou sobre si as nossas enfermidades e as nossas dores levou sobre si; e nós o reputávamos por aflito, ferido de Deus e oprimido. Mas ele foi traspassado pelas nossas transgressões e moído pelas nossas iniquidades; o castigo que nos traz a paz estava sobre ele, e pelas suas pisaduras fomos sarados.” (Isaías 53: 4-5)



## RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é altamente tóxico para o cérebro humano. Embora muito se saiba sobre os efeitos neurotóxicos do MeHg, os efeitos do MeHg nos neurotransmissores cerebrais ainda são pouco explorados. Neste estudo, avaliamos os efeitos da intoxicação por MeHg no estresse oxidativo do hipocampo, biomarcadores de neuroinflamação e níveis de neurotransmissores em camundongos C57BL6J. Foram usados camundongos machos com 6 semanas de idade. Os camundongos foram alojados em gaiolas microisoladoras e receberam água e comida ad libitum. Camundongos intoxicados receberam MeHg em água potável (20 mg / L) por vinte dias. Todos os protocolos foram aprovados pela CEUA / UNIFOR (protocolo nº015 / 2015). Amostras do hipocampo foram colhidas e congeladas rapidamente para avaliar os níveis de mieloperoxidase (MPO), glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA) ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína), por ELISA. Monoaminas hipocampais (dopamina e metabólitos) e neurotransmissores de aminoácidos (taurina, glutamato, ácido gama aminobutírico-GABA, tirosina e glicina) foram avaliados por HPLC. O teste T de *Student* não pareado foi usado para confirmar dados significantes.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. A intoxicação mercurial foi confirmada, por um aumento ( $p < 0,0001$ ) da concentração de Hg no pelo do grupo MeHg. Os animais intoxicados apresentaram um menor ganho de peso ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo controle. Concentrações mais elevadas de MPO ( $p < 0,0001$ ) e MDA ( $0,0001$ ) foram observados nos animais do grupo MeHg em comparação ao grupo controle. As concentrações de dopamina hipocampal (DA) foram semelhantes nos grupos controle e intoxicado, no entanto, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), um dos metabólitos de DA, foram aumentados ( $0,41 \pm 0,081 \text{ ng/g}$ ) ( $p < 0,0003$ ) no hipocampo do grupo intoxicado em relação ao grupo controle ( $0,08 \pm 0,012 \text{ ng/g}$ ). Em relação a concentração de aminoácidos em ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de tecido), foi observado um aumento dos níveis de glutamato no grupo MeHg ( $251,9 \pm 26,68$ ) em relação ao controle ( $129,1 \pm 22,48$ ) ( $p < 0,003$ ), taurina grupo MeHg ( $1141 \pm 234$ ) X grupo controle ( $542,5 \pm 126,7$ ) ( $p < 0,05$ ) e GABA grupo MeHg ( $16775 \pm 1592$ ) X grupo controle ( $7642 \pm 1964$ ) ( $p < 0,002$ ). Em conjunto, os achados do presente estudo mostram alterações bioquímicas importantes no hipocampo, estresse oxidativo elevado e inflamação relacionada à MPO.

**Palavras-Chave:** Metilmercúrio, hipocampo, estresse oxidativo, inflamação, neurotransmissores.

## ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is highly toxic to the human brain. Although much is known about the neurotoxic effects of MeHg, the effects of MeHg on brain neurotransmitters are still little explored. In this study, we evaluated the effects of MeHg poisoning on hippocampus oxidative stress, neuroinflammation biomarkers and neurotransmitter levels in C57BL6J mice. Male rats at 6 weeks of age were used. The mice were housed in microinsulating cages and received water and food ad libitum. Intoxicated mice received MeHg in drinking water (20 mg/L) for twenty days. All protocols were approved by CEUA / UNIFOR (protocol no. 015 / 2015). Hippocampus samples were collected and frozen rapidly to evaluate the levels of myeloperoxidase (MPO), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein) by ELISA. Hippocampal monoamines (dopamine and metabolites) and amino acid neurotransmitters (taurine, glutamate, gamma aminobutyric acid-GABA, tyrosine and glycine) were evaluated by HPLC. The unpaired Student's T-test was used to confirm significant data.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Mercurial intoxication was confirmed by an increase ( $p < 0.0001$ ) of Hg concentration in the MeHg group. The intoxicated animals had a lower weight gain ( $p < 0.0001$ ) compared to the control group. Higher concentrations of MPO ( $p < 0.0001$ ) and MDA (0.0001) were observed in the animals of the MeHg group compared to the control group. Hippocampal dopamine (AD) concentrations were similar in the control and intoxicated groups, however, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), one of the metabolites of AD, were increased ( $0.41 \pm 0.081$  ng/g) ( $p < 0.0003$ ) in the hippocampus of the intoxicated group in relation to the control group ( $0.08 \pm 0.012$  ng/g). Regarding the concentration of amino acids in ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  of tissue), an increase in glutamate levels was observed in the MeHg group ( $251.9 \pm 26.68$ ) in relation to the Control ( $129.1 \pm 22.48$ ) ( $p < 0.003$ ), taurine group MeHg ( $1141 \pm 234$ ) X Control group ( $542.5 \pm 126.7$ ) ( $p < 0.05$ ) and GABA group MeHg ( $16775 \pm 1592$ ) X Control group ( $7642 \pm 1964$ ) ( $p < 0.002$ ). Together, the findings of the present study show important biochemical changes in the hippocampus, high oxidative stress and MPO-related inflammation.

**Key words:** Methylmercury, hippocampus, oxidative stress, inflammation, neurotransmitters

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ciclo do Mercúrio no ambiente .....	19
<b>Figura 2</b> – Mapa dos estudos sobre contaminação ambiental por Hg no Brasil de 2010-2019 .....	20
<b>Figura 3</b> - Mapa dos estudos sobre contaminação humana por Hg no Brasil de 2010 - 2019	21
<b>Figura 4</b> – Extensão da lama na cidade de Mariana-MG .....	23
<b>Figura 5</b> – Mapa do percurso dos rejeitos de mineração em Brumadinho .....	24
<b>Figura 6</b> - Mapa da área de estudo (Povo indígena Munduruku).....	25
<b>Figura 7</b> - Esquematização da principal via de entrada do MeHg no Sistema Nervoso Central .....	27
<b>Figura 8</b> - Efeitos do MeHg sobre a homeostase de glutathiona.....	28
<b>Figura 9</b> - Representação anatômica do hipocampo e suas subdivisões .....	29
<b>Figura 10</b> - Delineamento experimental .....	41
<b>Figura 11</b> - Microisoladores com símbolos de risco biológico e o diagrama de Hommel.....	42
<b>Figura 12</b> - Concentração de MeHg por kg de pelo .....	48
<b>Figura 13</b> – Percentual de ganho de peso dos grupos experimentais .....	49
<b>Figura 14</b> – Dosagem de GSH em amostras de hipocampo .....	50
<b>Figura 15</b> – Dosagem de MDA em amostras de hipocampo.....	50
<b>Figura 16</b> - Avaliação da atividade enzimática de MPO em hipocampo .....	51
<b>Figura 17</b> - Análise da concentração de DA em hipocampo de camundogos C57BL/6.....	52
<b>Figura 18</b> - Análise da concentração de DOPAC em hipocampo de camundogos C57BL/6 .	52
<b>Figura 19</b> - Análise da concentração de glutamato em hipocampo de camundogos C57BL/6 .....	53
<b>Figura 20</b> - Análise da concentração de glicina em hipocampo de camundogos C57BL/6....	54
<b>Figura 21</b> - Análise da concentração de taurina em hipocampo de camundogos C57BL/6....	54
<b>Figura 22</b> - Análise da concentração de tirosina em hipocampo de camundogos C57BL/6...	55
<b>Figura 23</b> - Análise da concentração de GABA em hipocampo de camundogos C57BL/6....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características físico-químicas do MeHg.....	17
--	----

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	<b>Mercúrio</b>	15
1.2	<b>Contaminação Ambiental e Humana por MeHg</b>	19
1.2.1	<i>Desastres ambientais nas cidades de Mariana e Brumadinho</i>	23
1.2.2	<i>Contaminação do povo indígena Munduruku</i>	24
1.3	<b>Impacto da Intoxicação Mercurial no Sistema Nervoso Central</b>	26
1.4	<b>Hipocampo</b>	29
1.4.1	<i>Neurotransmissores e Hipocampo</i>	31
1.4.2	<i>Ação do MeHg sobre o Hipocampo</i>	35
2	<b>JUSTIFICATIVA</b>	38
3	<b>OBJETIVOS</b>	39
3.1	<b>Objetivo Geral</b>	39
3.2	<b>Objetivos Específicos</b>	39
4	<b>MATERIAS E MÉTODO</b>	40
4.1	<b>Animais</b>	40
4.2	<b>Delineamento Experimental</b>	40
4.2.1	<i>Protocolo de Intoxicação mercurial</i>	41
4.2.2	<i>Eutanásia e coleta de amostras</i>	41
4.3	<b>Manejo e descarte do material intoxicado por MeHg</b>	42
4.4	<b>Porcentagem de ganho de peso</b>	43
4.5	<b>Dosagem de Metilmercúrio no pelo</b>	43
4.6	<b>Avaliação de Estresse Oxidativo em amostras de hipocampo</b>	44
4.6.1	<i>Determinação de glutathione – GSH</i>	44
4.6.2	<i>Determinação de Malondialdeído - MDA</i>	45
4.7	<b>Avaliação da Mieloperoxidase - MPO em amostras de hipocampo</b>	45
4.7.1	<i>Imunoensaio de Mieloperoxidase – MPO</i>	45
4.8	<b>Dosagem de Monoaminas e Aminoácidos em amostras de hipocampo</b>	46
4.9	<b>Análise estatística</b>	47
5	<b>RESULTADOS</b>	48
5.1	<b>Análise da concentração de MeHg por kg de pelo</b>	48
5.2	<b>Percentual de ganho peso dos grupos experimentais</b>	48
5.3	<b>Análise de Estresse Oxidativo no hipocampo</b>	49

5.3.1	<i>Dosagem de glutathiona redusida (GSH)</i> .....	49
5.3.2	<i>Dosagem de malondialdeído (MDA)</i> .....	50
5.4	<b>Avaliação das concentrações de MPO no hipocampo</b> .....	51
5.4.1	<i>Dosagem de mieloperoxidase (MPO)</i> .....	51
5.5	<b>Análise de Monoaminas no hipocampo</b> .....	51
5.5.1	<i>Dosagem de dopamina (DA)</i> .....	51
5.5.2	<i>Dosagem de Ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC)</i> .....	52
5.6	<b>Análise de Aminoácidos no hipocampo</b> .....	53
5.6.1	<i>Dosagem de glutamato</i> .....	53
5.6.2	<i>Dosagem de glicina</i> .....	53
5.6.3	<i>Dosagem de Taurina</i> .....	54
5.6.4	<i>Dosagem de tirosina</i> .....	55
5.6.5	<i>Dosagem de GABA</i> .....	55
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
	<b>APÊNDICE A – MAPA CONCEITUAL SOBRE A CONTAMINAÇÃO POR METILMERCÚRIO</b> .....	77
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	78

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um elemento natural encontrado no meio ambiente sendo o único elemento metálico líquido a temperatura ambiente. Em altas temperaturas, passa a apresentar-se na forma gasosa de caráter tóxico, inodoro e incolor. Esse metal pode assumir diversas formas orgânicas, entre as quais o metilmercúrio, produto da metilação do mercúrio no processo resultante do metabolismo de bactérias presentes no meio aquático, sendo altamente tóxico (BRASIL, 2020).

O Hg está naturalmente presente no meio ambiente, sendo liberado na biosfera terrestre por atividade vulcânica e intemperismo de rochas. A presença desse metal disperso na natureza tem sido maximizada pela intervenção humana relacionada à extração dos minerais como cinabre (HgS) e ouro, a partir da formação do amálgama de ouro com mercúrio. Além disso, o Hg é encontrado em petróleo e carvão, que se caracterizam como subprodutos da extração, podendo ser dissipado na forma de vapor de Hg<sup>0</sup> altamente tóxico (PACYNA et al., 2010).

Tanto a saúde humana quanto a de animais é comprometida próximo aos locais que utilizam esses metais, sendo a intoxicação por exposição através da via oral a principal via de contaminação, pela sua iforma orgânica (MeHg), seguida pela via respiratória e via cutânea, sendo essas últimas, as principais vias de intoxicação pelas formas de Hg inorgânicas (LU et al., 2017). Desse modo, segundo o Ministério da Saúde, a intoxicação mercurial é de extrema importância epidemiológica, por promover nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, além de danos severos ao sistema nervoso central (BRIDGES; ZALUPS, 2017; MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000).

O metilmercúrio (MeHg) é uma espécie química orgânica de Hg<sup>2+</sup> com grande relevância toxicológica, devido principalmente à sua capacidade de bioacumulação ambiental e em tecidos de organismos vivos, o que pode ser um fator prejudicial tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente.

Uma vez que o CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> (metilmercúrio) também é solúvel em água e é facilmente absorvido pelos microorganismos (TOMIYASU et al., 2000), tendendo a uma bioacumulação (LÁZARO et al., 2013), principalmente devido à sua afinidade por grupos sulfidríla de proteínas (MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000). Como consequência, o Hg se biomagnifica na cadeia alimentar e pode alcançar os organismos vivos do topo da cadeia, como os seres

humanos. Estudos alertam que a grande parte de Hg acumulado no tecido muscular de peixes está na forma de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , representando uma ameaça para os seres humanos e a biota (CARRASCO et al., 2011; BLOOM, 1992). Os efeitos mais preocupantes de sua intoxicação são danos irreparáveis ao sistema nervoso central (MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000).

### **1.1.1 Metilmercúrio**

O mercúrio pode assumir diferentes formas orgânicas. Dentre elas, o metilmercúrio (MeHg) é uma das formas mais tóxicas, sendo o produto da metilação do mercúrio, pelo processo de metabolização do Hg pelas bactérias presentes no ambiente aquático. O MeHg é um metal orgânico com neurotoxicidade reconhecida, principalmente para o desenvolvimento do sistema nervoso (BOSE et al., 2012). No ambiente aquático, o monometilmercúrio (MMHg), pode estar presente na base da cadeia alimentar por aumento da sua bioconcentração incorporando-se a fitoplancton e zooplancton uma vez que é solúvel e facilmente absorvido pelos microorganismos (TOMIYASU et al., 2000), ele tende a uma bioacumulação (LÁZARO et al., 2013), principalmente devido à sua afinidade por grupos sulfidríla de proteínas (MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000). O mercúrio também pode ser metilado por microorganismos metanônicos (arqueobactérias anaeróbias que possuem capacidade de fabricar o gás metano) indicando, portanto, que o MeHg pode ser acumulado em sedimentos empobrecidos de sulfato e Fe (III), presente em amostras de água anóxicas (BIGHAM et al., 2017).

As manifestações clínicas mais significativas pela intoxicação mercurial são de caráter neurológico, pois o cérebro tem uma maior afinidade com MeHg, sendo encontrado nesta região em torno de 10% do metilmercúrio contido no corpo (3 a 6 vezes maior que a quantidade encontrada no sangue), por consequência, induzindo neurotoxicidade. A extensão e severidade da ação neuropatológica dependem do nível de intoxicação, região cerebral afetada, ambiente redox, envolvimento celular e do estágio de desenvolvimento, (SYVERSEN; KAUR, 2012; FUJIMURA; USUKI, 2017).

Pesquisas apontam que grande parte de Hg acumulado em músculo de peixe está na forma de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , representando uma ameaça para os seres humanos e ao bioma (CARRASCO et al., 2011; BLOOM, 1992). Tais fatores acarretam uma bioacumulação preocupante, uma vez que as concentrações da forma orgânica do Hg aumentam proporcionalmente ao nível trófico, Como consequência, o Hg se biomagnifica na cadeia alimentar, alcançando organismos do topo, dentre os quais, os seres humanos (HONG; KIM;



LEE, 2012).

De acordo com as suas características físico-químicas (**Tabela 1**), o metilmercúrio tem um ponto de fusão de 170 ° C, sendo de carácter estável, exceto na presença de oxidantes fortes. Sua dose letal para ratos é de 1,95 mg / kg e tem solubilidade de 6 mg / L em água a 25 ° C e 94 mg / m<sup>3</sup> em vapor a 20 ° C (BISINOTI; JARDIM, 2004).

**Tabela 1** - Características físico-químicas do MeHg

Propriedades	Indicativos
Fórmula molecular	CH <sub>3</sub> HgX <sup>-</sup>
Ponto de Fusão	170 °C
Gravidade Específica	4,06
Estabilidade	Estável
Toxicidade	Alta
Dose letal em ratos (DL-50)	1,95mg / kg <sup>-1</sup>
Primeiros sintomas de contaminação humana	200 – 500 ng/mL <sup>-1</sup> de MeHg no sangue
Solubilidade a 25°C	> 6 mg/L
Concentração de saturação do vapor a 20 °C	94 mg/m <sup>3</sup>

**Fonte:** Adaptado de Bisinoti; Jardim, 2004.

A estabilidade do MeHg muda de acordo com o local de armazenamento, influência da temperatura e tipo de solvente. Estudos demonstraram que uma solução contendo 10 µg / L de MeHg é estável em água ultrapura por 8 semanas, quando armazenada a 5 ° C. Por outro lado, quando a solução é armazenada em temperatura ambiente, ocorre uma perda de 15% do MeHg na primeira semana e de 50% na segunda. Também foi demonstrado que a mesma solução é estável em HNO<sub>3</sub> a 20% (m / v) por um período de 12 semanas, quando armazenada em frasco de vidro a 5 ° C ou em recipiente de politetrafluoroetileno (PTFE) armazenado em temperatura ambiente no escuro (LANSENS et al., 1990).

Soluções contendo 0,08 µg / L de MeHg a pH 6,0 armazenadas em recipiente de vidro permanecem estáveis por 5 dias, período após o qual o MeHg é convertido em mercúrio inorgânico. O armazenamento do MeHg em diclorometano também não preserva suas propriedades, já que pode ser convertido em mercúrio inorgânico em um período de 15 dias (BISINOTI; JARDIM, 2004; LANSENS et al., 1990).

A exposição ao MeHg promove agudamente em baixas doses, sintomas neuromotores e neurológicos como tremores e possíveis delírios, já cronicamente, pode promover patologias como depressão e ansiedade, além de um potencial aumento no risco de

doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (BITENCOURT et al., 2013; BJØRKLUND et al., 2019; CHANG et al., 2008). Além dos danos neurais, o MeHg é também altamente hepatotóxico, tendo sido observada uma ação direta sobre as mitocôndrias de hepatócitos de ratos expostos, por meio da abertura do poro de transição da permeabilidade, deste modo, sendo um fator determinante no mecanismo de morte celular, de forma semelhante ao seu mecanismo neurotóxico (ROOS et al., 2011).

Diferente do Hg inorgânico, que possui uma absorção pelas vias aéreas como principal meio de intoxicação, a via oral é um dos meios de principal exposição humana ao MeHg, que apesar de ter seu ciclo iniciado a partir do metabolismo bacteriano, acaba por chegar aos níveis tróficos mais altos como peixes carnívoros, promovendo um risco real, uma vez que a pesca, geralmente é a base da alimentação de habitantes de regiões com risco de contaminação mercurial, e cerca de 95% do mercúrio contido nos peixes é absorvido pelo trato gastrointestinal humano (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011; VÁZQUEZ; DEVESA; VÉLEZ, 2014).

O efeito neurotóxico tem sido atribuído principalmente a fatores como, aumento do estresse oxidativo a partir da quebra da homeostase mitocondrial, desequilíbrio na neurotransmissão de glutamato e GABA, além de aumento da apoptose pela via da Caspase-3 ligada a hiperativação da cascata de ativação de p38 e MAPK (HEIMFARTH et al., 2018; ALLEN; MUTKUS; ASCHNER, 2001).

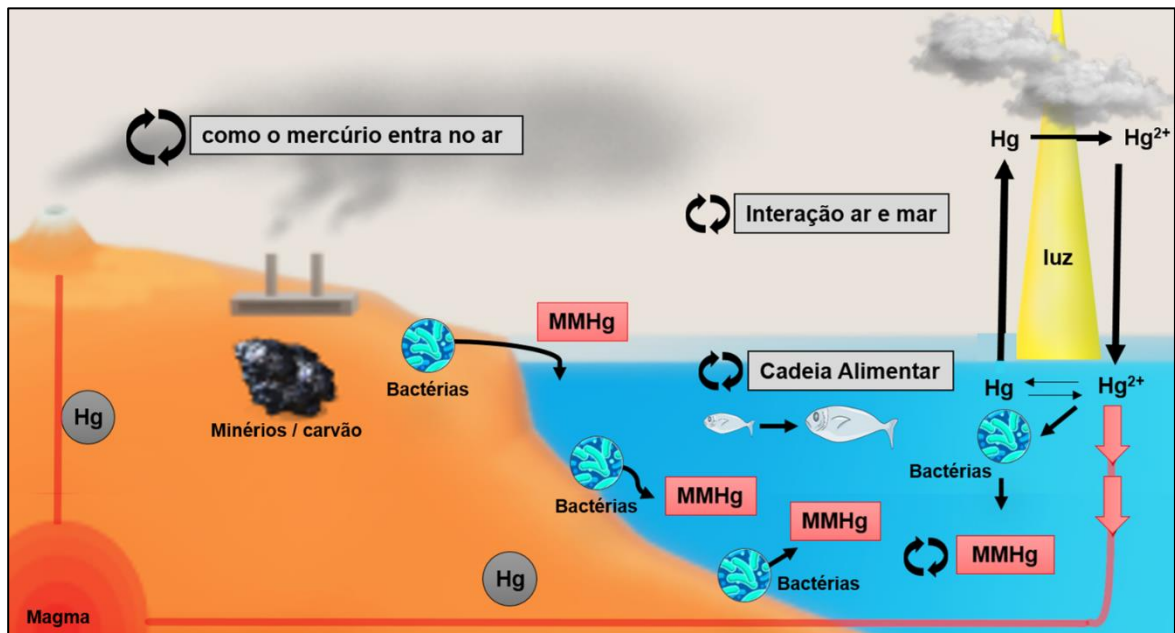
A curva de meia-vida do MeHg presente na corrente sanguínea possui grande variação entre adultos, que é de aproximadamente 2 meses e recém-nascidos ou fetos, nos quais ocorre por um período mais prolongado, devido à menor quantidade de transportadores celulares que apresentam. Isso também pode estar relacionado a passagem ou transferência de MeHg através da placenta, atingindo, no sangue do cordão umbilical níveis 1,7 vezes maiores do que no sangue e leite maternos (CECCATELLI; ASCHNER, 2013; PARK et al., 2018)

A utilização de modelos *in vitro* para avaliação neurotoxicidade do MeHg, permitiu a identificação da ocorrência da depleção de glutatona (GSH) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (KAUR; ASCHNER; SYVERSEN, 2006; SARAFIAN et al., 1994). Devido à alta afinidade do MeHg apresenta pelas formas aniônicas de tióis, esta interação, como por exemplo nas moléculas de GSH, é a responsável pela maioria dos efeitos tóxicos do MeHg (DOS SANTOS et al., 2018). Atualmente, sugere-se que o MeHg seja eliminado do citoplasma pela ligação a glutatona (GSH), formando o complexo GSHgCH<sub>3</sub>, que é então transportado para o meio extracelular por proteínas multirresistentes (PMRs) (RUSH et al., 2012).

## 1.2 Contaminação Ambiental e Humana por MeHg

Os desastres com Hg e outros metais pesados possuem um potencial de destruição ambiental assim como repercussão social gigantesca. No mundo, o desastre de Minamata, no Japão, é o primeiro caso relatado em 1956. Mesmo 50 anos depois do incidente, ainda estavam sendo descobertas questões cruciais no entendimento do processo neurotóxico em humanos e a gravidade da contaminação ambiental. Por exemplo, foram reportados, somente 50 anos depois, que grandes quantidades de MeHg foram produzidas no processo do desastre, exatamente pela interação com o bioma local, aonde o MeHg foi produzido a partir da interação das bactérias com o Hg(i) (**Figuras 1**) (ETO, 2006).

**Figura 1** – Ciclo do Mercúrio no ambiente



Fonte: Adaptado de Winner, 2010.

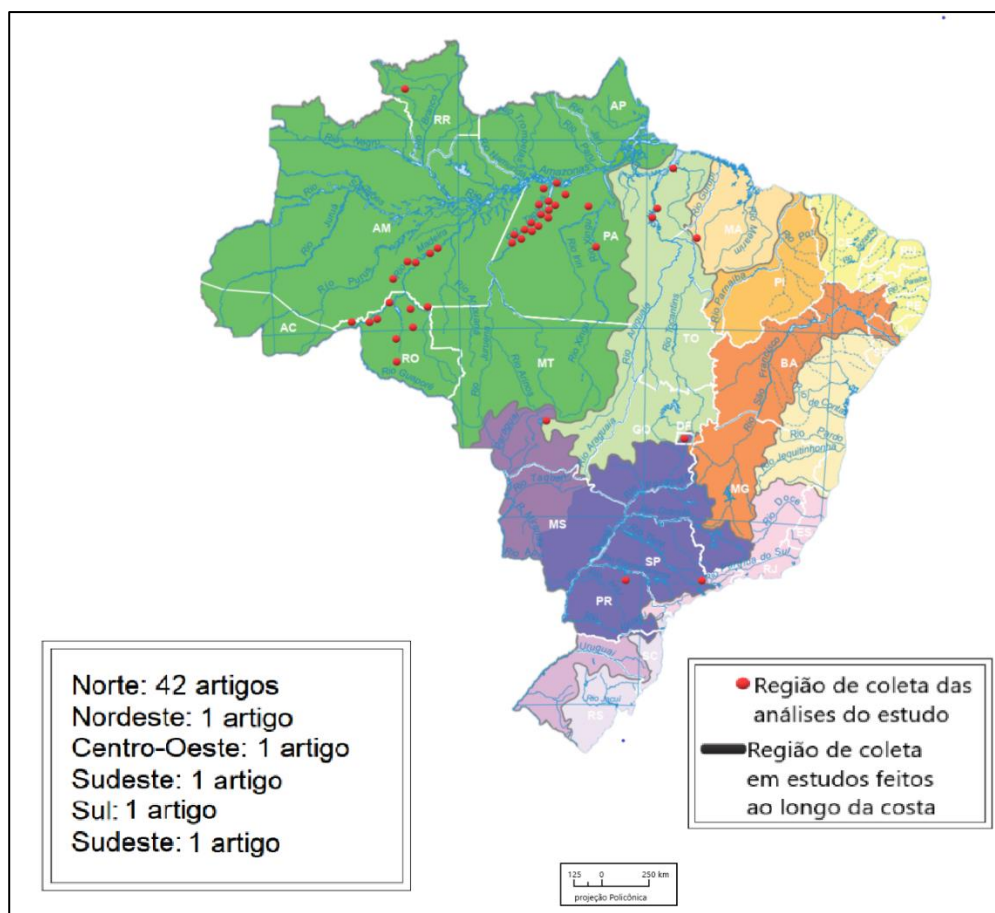
No Brasil, a partir de um levantamento da literatura feito por nosso grupo de pesquisa nas principais bases de dados, sobre estudos relacionados a Hg e danos ambientais e a saúde humana (**Figuras 2 e 3**), foi montado um mapa sobre a quantidade de artigos publicados para cada região. É possível observar, que a maior concentração de casos está na região norte (bacia amazônica), seguida por região sudeste e nordeste.

**Figura 2** – Mapa dos estudos sobre contaminação ambiental por Hg no Brasil de 2010-2019



**Fonte:** Autoria própria

**Figura 3** - Mapa dos estudos sobre contaminação humana por Hg no Brasil de 2010 - 2019



**Fonte:** Autoria própria

A contaminação por Hg na região Norte do Brasil, necessita de uma atenção especial, uma vez que, a bioacumulação do MeHg nos níveis tróficos mais elevados, está principalmente nos peixes carnívoros, que são a base alimentar das comunidades ribeirinhas da Amazônia brasileira (BERZAS NEVADO et al., 2010; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2002). Nas bacias do Amazonas e do Orinoco, a contaminação por Hg se dá pela extração artesanal e industrial de ouro desde a época colonial. Além disso, o desmatamento e a queima da floresta tropical promovem o surgimento de depósitos naturais de Hg, por sua vez, sofrendo metilação das bactérias, gerando o MeHg, afetando assim o bioma aquático e locais próximos (MOSQUERA-GUERRA et al., 2019).

A Região Nordeste é, depois da Amazônia brasileira, a região com maior consumo de pescado por habitante do país. É também uma região com uma quantidade considerável de descarte inadequado de resíduos industriais, embora não seja comparável aos valores da Região Norte. Com base nisso, estudos recentes têm buscado avaliar os níveis de mercúrio em animais que estão entre os consumidos pela população local, bem como no solo, na água e no meio

ambiente em geral (DE LACERDA; MALM, 2008).

Em estudo de Hatje et al., (2019), foram avaliados os impactos da intervenção humana ao longo do tempo na Baía de Todos Santos, no estado da Bahia, e a partir disso, a quantidade de Hg contaminado no meio ambiente local. O estudo mostrou que as concentrações de Hg variaram substancialmente de um ponto de coleta para outro ( $5-3500 \mu\text{g} / \text{kg}^{-1}$ ), o que representa uma grande variabilidade espacial e temporal, sendo evidenciado que apesar de algumas regiões de coleta não terem quantidade significativa de Hg, em certos pontos as quantidades de Hg encontradas nos sedimentos estudados propicia a contaminação do ecossistema e também de humanos.

O sudeste brasileiro é caracterizado pela presença massiva de fábricas próximas às grandes cidades. As cidades do interior também são grandes produtoras de insumos alimentares, mantendo os mercados das grandes cidades. A preservação da qualidade da água e o controle dos níveis de Hg é de grande impacto para saúde pública.

Solo e água são capazes de acumular resíduos descartados no local ao longo dos anos, tornando-os importantes marcadores de contaminação ambiental. O uso do mercúrio na mineração e na fabricação de tecidos, nos séculos 18 e 19, contribuiu para a poluição do solo e dos sedimentos nas regiões Sul e Sudeste. Apesar do tempo decorrido, muitos estudos mostram que mesmo após tanto tempo níveis significativos de Hg ainda podem ser encontrados em alguns locais (DA ROSA QUINTANA; MIRLEAN, 2019; TINÔCO et al., 2010).

Os animais marinhos são importantes biomarcadores de contaminação por mercúrio. Pesquisas, realizadas nas costas sul e sudeste, mostraram que os peixes podem acumular níveis alarmantes de Hg nos músculos. Os mais afetados são os carnívoros, que vivem em regiões próximas a locais de atividade industrial (AZEVEDO et al., 2011; BAPTISTA et al., 2016; CONDINI et al., 2017; DE CARVALHO et al., 2014; KEHRIG et al., 2013). Estudos em amostras de outros animais, como golfinhos (BAPTISTA et al., 2016), mexilhões, anêmonas (RIZZINI ANSARI et al., 2016) e caranguejos (DE ALMEIDA RODRIGUES et al., 2020) também resultaram em níveis preocupantes de mercúrio. Ao contrário dos resultados obtidos com amostras de peixes criados em cativeiro (BOTARO et al., 2012) e enlatados (ALVES et al., 2017; DE PAIVA; MORGANO; MILANI, 2017), que apresentaram níveis aceitáveis e dentro do limite recomendado pelas autoridades.

### 1.2.1 Desastres ambientais nas cidades de Mariana e Brumadinho

Um desastre ambiental de grandes proporções foi o rompimento da barragem do Fundão, em 2015, situada no município de Mariana, estado de Minas Gerais. Foi um desastre cujas proporções sociais e ambientais foram além das fronteiras do município, na prática, atingindo 36 municípios diretamente, repercutindo em todo o Brasil e no mundo, com um fluxo de mais de 50 milhões de m<sup>3</sup> de lama tóxica ao longo de 663 km de extensão (**Figura 4**), contendo mercúrio e outros metais pesados, resquícios da mineração na área, atingindo tanto seres humanos quanto a biota local, influenciando mesmo após o desastre, o crescimento de espécies de plantas locais (DE FREITAS et al., 2019; ESTEVES et al., 2020; CRUZ et al., 2020).

**Figura 4** – Extensão da lama na cidade de Mariana-MG



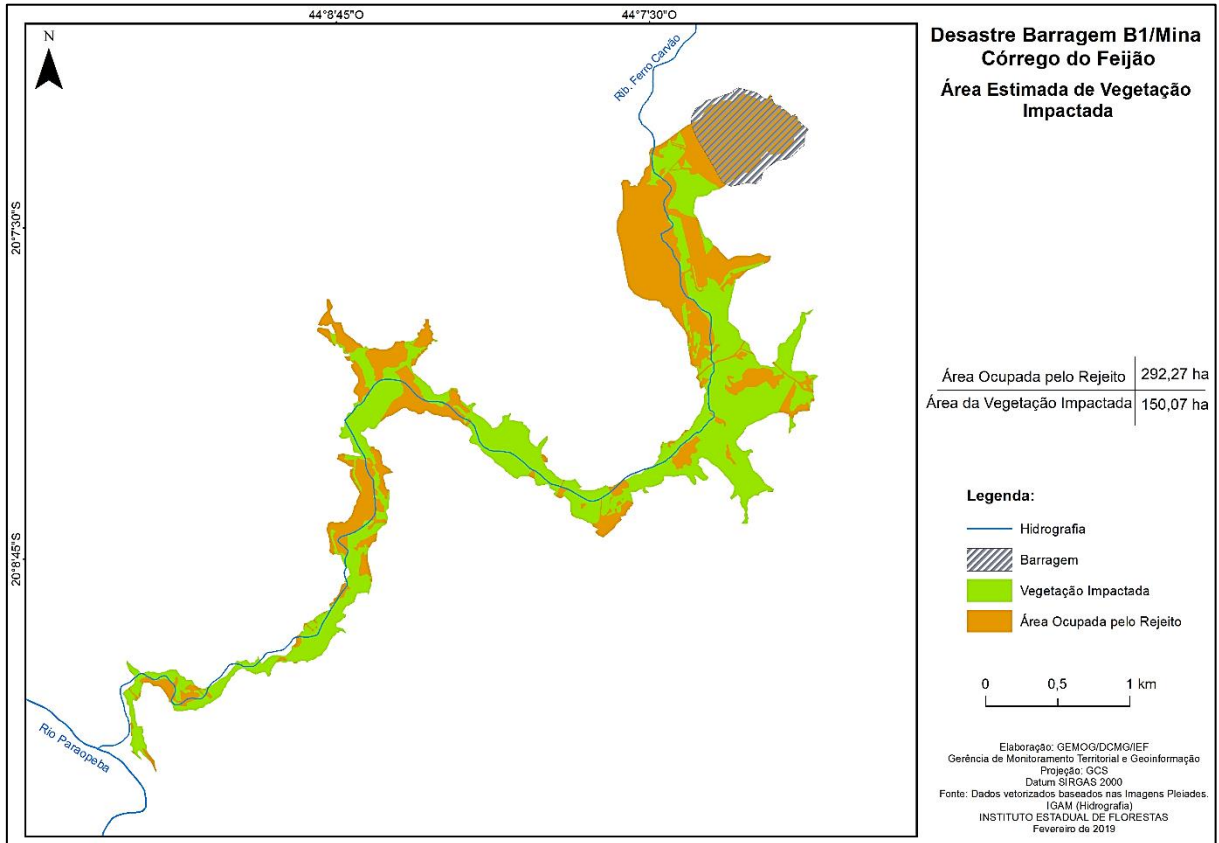
Fonte: GREENPIECE, 2017.

Outro desastre em solo brasileiro, mais recente ocorreu em 2019 com o rompimento da barragem de Córrego do Feijão, na cidade de Brumadinho, também no estado de Minas Gerais, provocando um derramamento de mais de 12 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos minerais (**Figura 5**), provocando a morte de mais de 250 pessoas, além de danos graves ao meio ambiente, como da deposição de metais pesados na água do rio Paraopeba atingindo os mais variados níveis tróficos, assim como a bioacumulação de metais pesados no tecido de peixes



das espécies nativas do rio, sendo o MeHg um dos metais acumulados (VERGILIO et al., 2020; THOMPSON et al., 2020).

**Figura 5** – Mapa do percurso dos rejeitos de mineração em Brumadinho



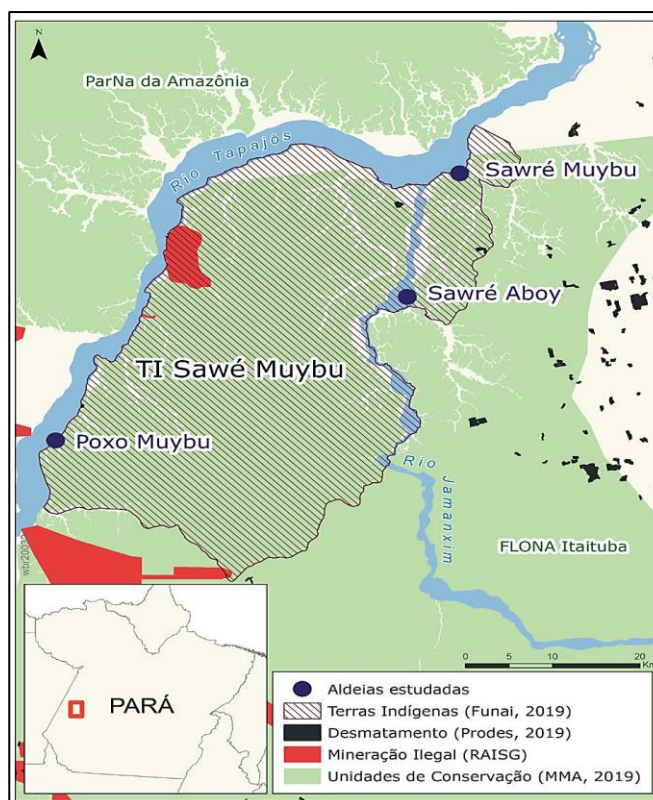
**Fonte:** IEF, 2019.

### 1.2.2 Contaminação do povo indígena Munduruku

Os dados mais recentes sobre contaminação massiva por Hg no Brasil, foram levantados a partir de estudo feito pela *World Wide Fund for Nature* (WWF) em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), publicado em forma de nota técnica no mês de novembro de 2020, confirmou que os garimpos ilegais tem promovido um impacto socioambiental crescente nos últimos 20 anos (**Figura 6**), a partir de uma avaliação dos níveis de contaminação nos peixes da região, fonte de alimentação das aldeias, além de avaliação neurológica, pediátrica e de polimorfismos genéticos da população indígena (BASTA; HACON, 2020).



**Figura 6** - Mapa da área de estudo (Povo indígena Munduruku)



**Fonte:** Basta; Hacon, 2020.

Entre os principais achados estão que, 6 em cada 10 dos 197 avaliados apresentaram níveis de Hg no cabelo acima dos valores de referência, e 4 em cada 10 crianças menores de 5 anos apresentaram altas concentrações de Hg. Já em relação aos níveis de Hg nos peixes, as doses de Hg ultrapassam em mais de 40% os limites permitidos, o que significa um consumo da população de 2 a 9 vezes maior que os limites tolerados de Hg, de acordo com a OMS. Já em relação as avaliações neurológicas, 111 indígenas acima dos 12 anos foram avaliados, dos quais 32,4% apresentaram variadas formas de neuropatias periféricas. Já 15,8% de 57 crianças avaliadas entre 0 e 9 anos, apresentaram problemas de linguagem ou motores. Uma criança de apenas 11 meses apresentou déficits motores grossos, e foi detectado em sua amostra de cabelo níveis de Hg de  $19,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 3 vezes acima do limite de segurança. Essa nota emite um alerta crucial em relação aos problemas causados pelo Hg tanto no âmbito social quanto ambiental, principalmente quando advindo de fontes como Garimpos irregulares, os quais não possuem nenhum cuidado com despejo de rejeitos, ou responsabilidade ambiental (BASTA; HACON, 2020).

### 1.3 Impacto da Intoxicação Mercurial no Sistema Nervoso Central

A toxicidade do MeHg chama atenção por promover uma redução na quantidade, funcionalidade e capacidade de proliferação das células neurais devido exposição dessas a esse agente intoxicante de forma direta ou indireta, bem como alteração em sua morfologia, como o retardo no desenvolvimento de neuritos. Estas respostas resultantes da exposição ao MeHg foram observadas em estudos de células murinas *in vitro* e em estudos com células progenitoras neurais humanas primárias. Os principais resultados encontrados apontam para ações das vias Notch e alterações nos níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e alterações nos níveis e ação das quinases dependentes de ciclina, levando à toxicidade do MeHg (ATTOFF et al., 2017; EDOFF et al., 2017).

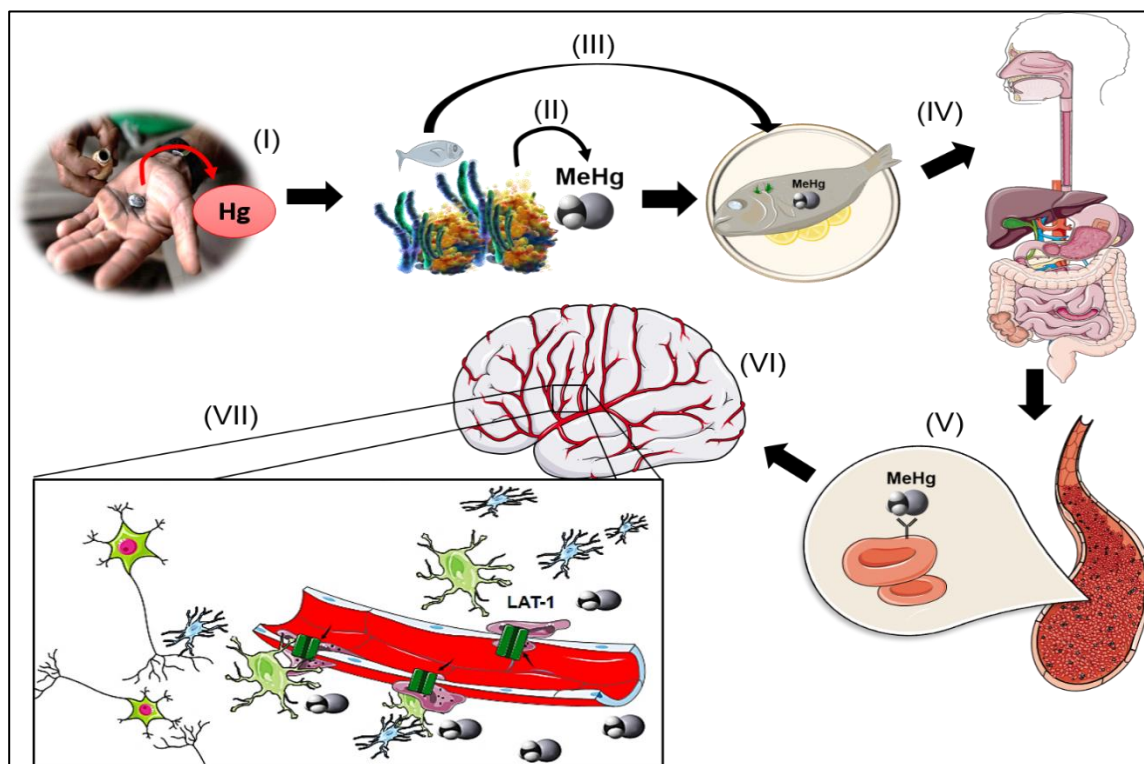
Ao ser absorvido, o MeHg possui facilitada passagem através da barreira .hematoencefálica, pela sua capacidade de formar um complexo de ligação com a cisteína (MeHg-Cys), mimetizando as características estruturais do aminoácido metionina (ROOS et al., 2010). Analisando a toxicidade do MeHg sobre células neurais, as respostas deletérias persistem mesmo por duas gerações além das linhagens celulares que tiveram contato direto com o composto em estudos *in vitro*. Esses dados corroboram com os achados de estudos *in vivo*, nos quais foi observado que a exposição perinatal ao MeHg produzia déficits comportamentais mesmo em longo prazo. A exposição da mãe também foi capaz de induzir alterações como atrasos e prejuízos no desenvolvimento dos filhotes, mesmo que não tenham sido expostos diretamente ao MeHg (BOSE et al., 2012; CASTOLDI et al., 2008; RADONJIC et al., 2013).

Em um estudo, de expressão gênica de biomarcadores neurais de mRNA, avaliada na exposição de uma cultura de uma linhagem de células progenitoras neurais multipotente, murinas, chamada C17.2, capaz de responder a estímulos do fator de crescimento nervoso e do BDNF, também capaz de se diferenciar em neurônios ou células gliais, observou-se que a expressão de biomarcadores de mRNA neural foi reduzida a partir da exposição à cultura de MeHg, assim como houve alterações na morfologia das células C17.2 mesmo quando expostas a níveis não citotóxicos de MeHg (ATTOFF et al., 2017).

Uma vez no sistema nervoso, o MeHg é transportado ao meio intracelular por transportadores de aminoácido tipo L-1 (LAT-1) (**Figura 7**), agindo principalmente nos astrócitos, por meio da superativação dos receptores N-Metil-D-aspartato e elevação dos níveis de glutamato extracelular, desbalanceando o influxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando desproporcionalmente os níveis destes íons no meio intracelular (ALLEN; MUTKUS;

ASCHNER, 2001).

**Figura 7** - Esquemática da principal via de entrada do MeHg no Sistema Nervoso Central

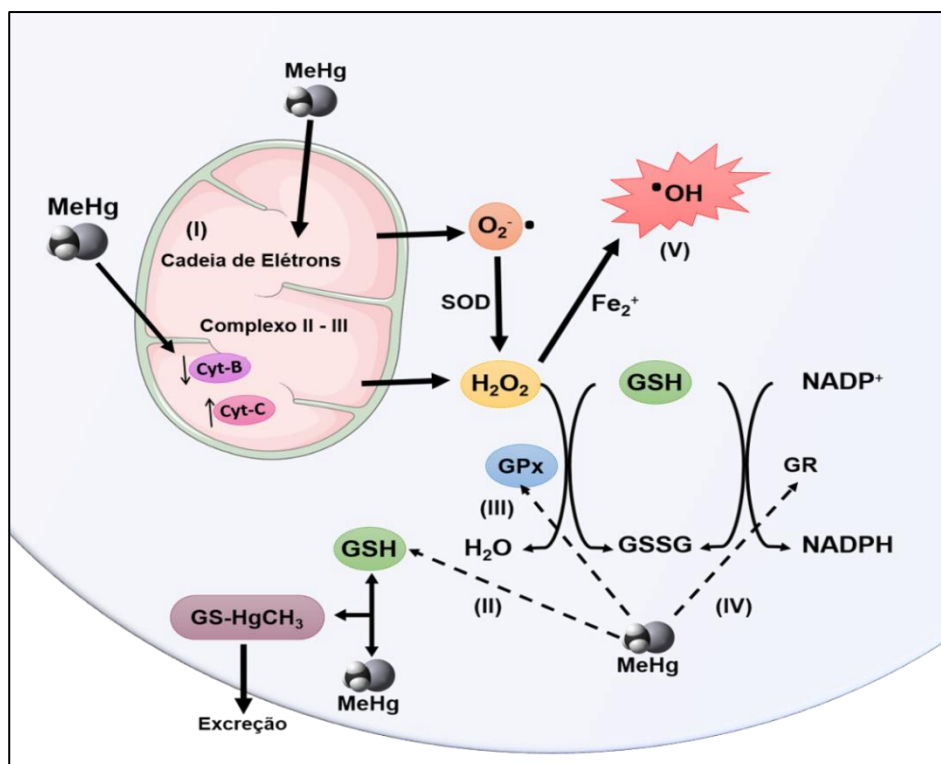


**Fonte:** Adaptado de Pinto, 2018.

(I) O Hg utilizado na atividade de mineração, é despejado no solo dos rios e oceanos. (II) Bactérias presentes na água são capazes de metilar Hg, gerando MeHg, assim contaminando o bioma aquático. (III) O MeHg é biomagnificado pela cadeia de peixes predadores. (IV) Após o consumo dos peixes contaminados, o MeHg é absorvido no trato gastrointestinal, (V) sendo totalmente absorvido após 30 horas, atinge os capilares, (VI) ligando-se à cadeia  $\beta$  da hemoglobina nas hemácias. (VII) O MeHg alcança a barreira hematoencefálica através do transportador L-aminoácido 1 (LAT1) chegando ao SNC e às células, como astrócitos, neurônios e micrógliia (BERNTSSEN et al., 2004; DOI, 1991; KERSHAW; DHAHIR; CLARKSON, 1980; YIN et al., 2008).

Promove o aumento do estresse oxidativo (**Figura 8**), principalmente ao ligar-se a glutationa peroxidase (GPx), pela já mencionada alta afinidade por grupos tiois e selenois, sendo um inibidor dessa enzima, com isso, prejudicando o ciclo de produção e interação de moléculas antioxidantes, principalmente no equilíbrio redox da GSH-GSSG, mecanismo diretamente relacionado ao distúrbio da atividade glutamatérgica. (FARINA; ASCHNER, 2019).

**Figura 8** - Efeitos do MeHg sobre a homeostase de glutatona



**Fonte:** Adaptado de Farina; Rocha; Aschner, 2011.

(I) O MeHg provoca uma série de eventos sobre a mitocôndria, interrompendo a cadeia de transporte de elétrons, diminuindo a produção de citocromo B (cyt-B), e aumentando a expressão de citocromo C (cyt-C), promovendo um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). (II) MeHg também reage com GSH, levando à depleção de GSH devido à formação do complexo MeHg-GSH ( $GS-HgCH_3$ ), que é excretado do corpo. O MeHg inibe o aumento das ações fisiológicas da glutatona redutase (GR) e a GPx no Sistema nervoso central (SNC) de roedores durante o período pós-natal inicial (III e IV) mas também diminui a atividade da GPx em animais adultos. Todos esses eventos (I-IV) culminam no aumento da geração de EROS e consequentemente do estresse oxidativo (V).

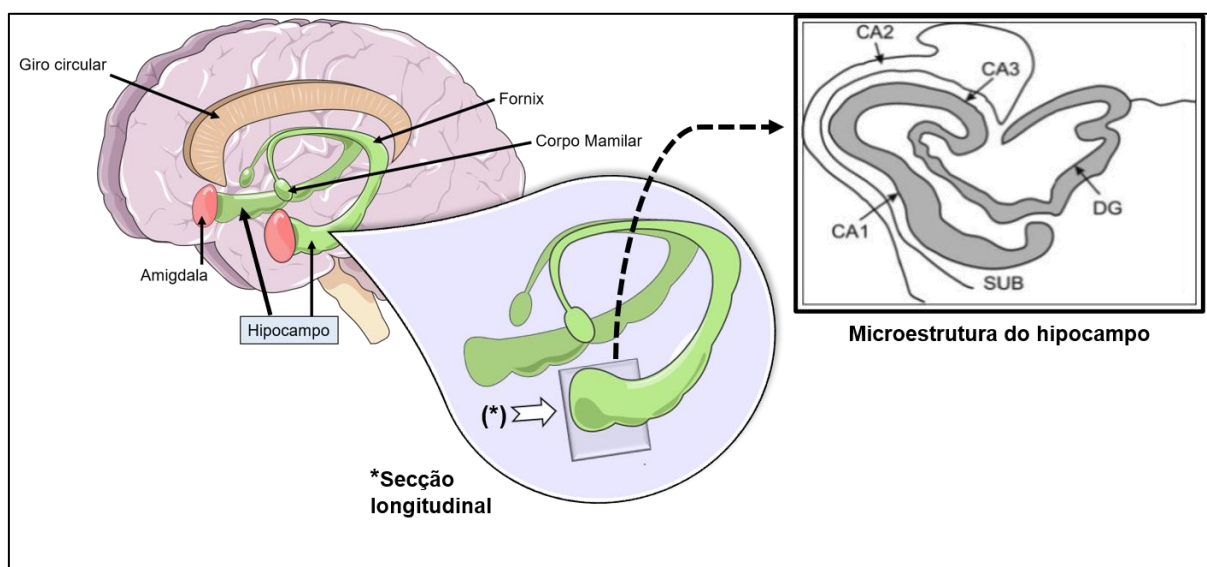
Quando transportado pelo LAT-1 para o meio intracelular de astrócitos e neurônios, o MeHg atua alterando a expressão de proteínas, dentre as quais a Bmi1, que tem sua expressão suprimida, é uma proteína fundamental para inibir a senescência de células nervosas. Foi observado um aumento na produção de proteínas P16 que se ligam ao complexo CDK4/Ciclina D e auxiliam no complexo CDK2/Ciclina E, nos astrócitos, além de um aumento na produção de P21, esta proteína se liga às ciclinas D e E (inibindo a atividade da quinase de CDK2 e 4), bem como a regulação positiva de GSK-3 $\beta$ . Além disso, como já mencionado, as mitocôndrias têm seus processos afetados pelo MeHg, tendo o ciclo da cadeia transportadora de elétrons prejudicado, com supressão da produção do cyt-B, com proeminente aumento da produção do cyt-C, levando a um consequente aumento da produção de EROS, posterior ativação da via das caspases e inibição dos complexos formados pela Ciclina D/CDK4 e Ciclina E/CDK2, cruciais na transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Além disso, ocorre a degradação da Ciclina

E, catalisada pela Caspase 3 e GSK-3 $\beta$ , resultando na redução da síntese de DNA e culminando na morte celular (ATTOFF et al., 2017; BOSE et al., 2012; CASTOLDI et al., 2008; EDOFF et al., 2017; RADONJIC et al., 2013).

#### 1.4 Hipocampo

O hipocampo é uma região altamente distinta e estruturada do cérebro. É uma estrutura compacta, alongada e curvada, com uma forma de cavalo-marinho, de onde vem seu nome. Existem dois hipocampos, localizados em cada lado do cérebro. Eles se encontram abaixo do neocórtex, na superfície medial basal dos lobos temporais. Os hipocampos são anatomicamente mais simples do que a maioria das outras áreas do SNC (**Figura 9**) (TAUPIN, 2007).

**Figura 9** - Representação anatômica do hipocampo e suas subdivisões



**Fonte:** Adaptado de Anand; Dhikav, 2012.

É composto por duas regiões: o giro denteado (GD) e Cornu Ammonis (CA). A região do Cornu Ammonis é subdividida em 4 seções, CA1, CA2, CA3 e CA4. O GD e CA contêm uma camada de células principais, as camadas de células grânulares e piramidais, respectivamente. A região CA1 é localizada próxima ao subículo. A região CA3 ao fórnice e ao plexo coróide. A região CA2 é uma pequena divisão entre CA1 e CA3, por fim, a região CA4 está localizada no hilo do GD (ABUHASAN; SIDDIQUI, 2019; DAUGHERTY et al., 2016).

A camada principal do GD contém os corpos celulares das células granulares, os dendritos proximais das células granulares estão na camada molecular, seus axônios, denominados de fibras musgosas, são projetados em direção às células piramidais do Cornu Ammonis conhecida como região CA3. As seções proximais das fibras musgosas ficam dispostas ao longo da camada polimórfica se prolongando até região CA3 (ABUHASAN; SIDDIQUI, 2019; TAUPIN, 2007).

A formação do hipocampo consiste de uma população de células granulares no giro denteado e células piramidais nas áreas CA1 e CA3. Os interneurônios estão presentes em todas as áreas do hipocampo. As principais vias de neurotransmissores são baseadas em glutamato. O hipocampo possui 3 vias neurais principais, a primeira é denominada via de fibras perfurantes, que vão do córtex entorrinal adentrando até a região das células granulares no giro dentado. Em seguida, estão as fibras musgosas, que fazem a conexão desde o giro denteado até os neurônios da região CA3. Por fim, temos as fibras colaterais de Schaffer, que conectam os neurônios da região CA3 aos neurônios da região CA1 do hipocampo (KNIERIM, 2015; KRICHMAR et al., 2005).

Ao longo dos níveis evolutivos, o hipocampo, em muitos animais, auxilia na avaliação do consumo de determinados alimentos quanto a serem seguros ou não para o consumo, com base no discernimento olfatório, além de responder a comportamentos sexuais através da ação dos feromônios e reagir a decisões de vida ou morte. É uma região destinada a tomada de decisão e armazenamento de informações na memória. Desse modo, age por converter a memória de curto prazo em longo prazo, solidificando o pensamento em informações, utilizado posteriormente na tomada de decisão (DAUGHERTY et al., 2016).

A estimulação hipocampal em qualquer das três vias aumenta o volume de potenciais pós-sinápticos excitatórios nos neurônios-alvo, esse mecanismo é denominado potenciação de longa duração (MÜNSTER-WANDOWSKI; GÓMEZ-LIRA; GUTIÉRREZ, 2013).

As fibras musgosas são formadas por axônios das células granulares do Giro denteado, os neurônios que formam essas fibras, são majoritariamente glutamatérgicos. Uma vez que o glutamato é liberado na fenda sináptica, pode se ligar aos receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) ou receptores não-NMDA presentes nos neurônios da região CA3. Uma vez que os receptores NMDA possuem pouca ação sobre a plasticidade sináptica o bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  nas células piramidais de CA3 não interfere nos potenciais de longa duração de modo significativo. Nas sinapses entre as células de CA3 e CA1 é necessária a liberação de  $NO_2$  pelas células de CA1, atuando como mensageiro retrogrado sobre as células de CA3,

sinalizando a necessidade de uma maior liberação de glutamato na fenda sináptica, implicando em um disparo de potencial de ação mais efetivo em CA1 (ABUHASAN; SIDDIQUI, 2019; TAUPIN, 2007).

Em situações fisiológicas, a regulação da liberação de glutamato nesses circuitos é feita a partir de estímulos noradrenergicos e serotoninérgicos. Essa modulação é necessária para que haja a consolidação da memória. A partir da ativação da adenil ciclase, gerando aumento da ativação de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e PKA (proteína quinase A), promovendo consequente aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  e liberação de glutamato na fenda sináptica (CIRANNA, 2006).

O GABA também é um neurotransmissor crucial no processo de formação de memória, uma vez que sua variação implica diretamente na consolidação ou não das informações. Quanto maior a quantidade de GABA hipocampal, maior a inibição dos neurônios presentes na via trisináptica e com isso, menor é a consolidação da memória (BRIONI, 1993; CIRANNA, 2006).

#### ***1.4.1 Neurotransmissores e Hipocampo***

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório dos mamíferos. Tendo um papel crucial nas transmissões sinápticas rápidas e na potenciação de longo prazo, exercendo papel de substrato molecular relacionado a aprendizagem e memória (ATTWELL, 2000). É um aminoácido não-essencial, que por não ter a capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica, é sintetizado por neurônios a partir de precursores locais, dentre os quais, a glutamina liberada por células gliais, é o principal nome. O glutamato é sintetizado a partir da ação da enzima glutaminase, sintetizada nas mitocôndrias, sobre a glutamina captada no terminal pré-sináptico (BROSNAN; BROSNAN, 2013; WALKER; VAN DER DONK, 2016). O glutamato também pode ser sintetizado a partir da transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato, um metabólito intermediário do ciclo de Krebs, assim parte da glicose metabolizada pelas células neurais pode ser utilizada na síntese do glutamato. Após ser sintetizado, o glutamato então é encapsulado em vesículas sinápticas pela ação dos receptores V-GLUT, sendo liberado posteriormente na fenda sináptica, a partir do estímulo promovido pelo influxo de íons  $Ca^{2+}$  no terminal axônico, o que estimula um potencial de ação neuronal com consequente fusão das vesículas sinápticas (BROSNAN; BROSNAN, 2013; WALKER; VAN DER DONK, 2016). Uma parte do glutamato sintetizado é utilizada ao se ligar nos receptores, outra porção é recaptada, principalmente pelas células



gliais, aonde é reconvertido em glutamina pela enzima glutamina-Sintetase (CRUZAT et al., 2018).

Em caso da ocorrência de excesso de glutamato na fenda sináptica, como é observado em situações de intoxicação mercurial ou situação de neuropatologias, o glutamato excedente promove uma despolarização neuronal com conseqüente abertura dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCCs, do inglês, *voltage operated calcium channels*), desbalanceando a homeostase desse íon, provocando por conseqüências danos e morte celular (MAHER et al., 2018).

Os receptores glutamatérgicos são divididos entre metabotrópicos e ionotrópicos, os receptores metabotrópicos,  $MGLU_R$ , são membros da família de receptores acoplados a proteína G ( $GPCRS$ ), com 7 domínios transmembrana, possuem respostas sinápticas mais lentas, propagando sinais de aumento ou redução da excitabilidade celular. Já na classe de receptores ionotrópicos ( $IGLUR$ ), temos a subdivisão entre NMDA e Não-NMDA (AMPA e Cainato), sendo os últimos dois, transportadores de íons  $Na^+$ , sendo promovido um potencial de ação excitatório a partir da ligação do Glutamato a esses receptores. Os receptores da classe de NMDA são canais iônicos permeáveis aos íons  $Ca^{2+}$ , e necessitam de uma despolarização prévia, para serem abertos, despolarização essa, promovida pelos receptores AMPA e Cainato, que estimulam um efluxo de  $Mg^{2+}$  (bloqueador dos canais), o que gera um aumento no influxo de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e efluxo de  $K^+$ . Uma observação importante é o fato de esses receptores só serem ativados em estímulos muito intensos. O glutamato está associado ao aprendizado e a memória por repetição, no hipocampo, as células da principal camada, células granulares e piramidais, são glutamatérgicas de ação excitatória, enquanto os interneurônios são gabaérgicos de ação inibitória (SCHEEFHALS; MACGILLAVRY, 2018; SPURNY et al., 2020).

As células da camada II do córtex entorrinal, principais aferências do hipocampo, também são glutamatérgicas de ações excitatórias. Sendo assim, o Hipocampo é principalmente dividido em um circuito trisináptico glutamatérgico, emissor de impulsos unidirecionais excitatórios. L-GLUT D e L-ASP, estão presentes em neurônios e células gliais, sendo transportados por transportadores de alta afinidade na membrana plasmática. O L-GLUT também é transportado em vesículas sinápticas independentes de gradiente de  $Na^+$  e dependente de  $Na^+K^+ATPase$  (TAUPIN, 2007).

Já entre os neurotransmissores com ações inibitórias, o GABA é o principal neurotransmissor no córtex adulto, sendo encontrado principalmente em interneurônios, circuitos locais e células de Purkinje (ROTH; DRAGUHN, 2012). O GABA é sintetizado a partir da ação da descarboxilase do ácido glutâmico/glutamato descarboxilase, subdivididas em



GAD65 e GAD67, que em ação sinérgica com o cofator piridoxal fosfato, a forma ativa da vitamina B6, convertem aminoácidos excitatórios em GABA. Podendo ter um papel mais relacionado a neurotransmissão quando sintetizada pela GAD65, ou fazendo parte dos mecanismos de surgimento de novas sinapses assim como efeito protetor contra lesões neurais, quando sintetizado pela GAD67 (AHNERT-HILGER; JAHN, 2011) podendo também promover o crescimento de neuritos por estímulo autócrino, com envolvimento dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (VAN KESTEREN; SPENCER, 2003). É observado na literatura que um dos fatores da diminuição da síntese de GABA se dá pela deficiência de Vitamina B6, o que propicia uma hiperexcitação do sistema nervoso (AHNERT-HILGER; JAHN, 2011; VAN KESTEREN; SPENCER, 2003).

Os neurônios gabaérgicos estão separados dentro de cinco grandes grupos, presentes em todo o córtex cerebral, sendo os 3 principais presentes no neocórtex os interneurônios PVALB, neurônios inibitórios encontrados em todo o córtex cerebral, Os neurônios denominados SSP, são neurônios inibitórios amplamente presentes no córtex dos mamíferos e são caracterizados por uma condensada rede sináptica local, possuem baixo limiar de disparo de potencial de ação, que persistem na ausência de entrada sináptica, e mais recentemente reconhecidos como uma classe distinta, estão os neurônios 5-HT<sub>3A</sub>R-positivos, ou neurônios que expressam o receptor 3A de serotonina. Uma vez sintetizado, o GABA é transportado para dentro de vesículas pelos transportadores da família  $\text{TVA}_i$  (transportador vesicular de aminoácidos inibitórios), sendo então liberado na fenda sináptica, após estímulo de um potencial de ação. Pode ser recaptado, tanto em neurônios quanto células gliais, por transportadores gabaérgicos (GAT), dependentes de  $\text{Na}^+$ , em seguida sofrendo a ação da enzima GABAtransaminase, gerando o succinato, que é utilizado no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) (HUANG; PAUL, 2019; LEE et al., 2010; URBAN-CIECKO; BARTH, 2016).

Os receptores gabaérgicos podem ser ionotrópicos,  $\text{GABA}_A$  e  $\text{GABA}_C$ , ou receptores metabotrópicos,  $\text{GABA}_B$ . Os receptores do tipo A e C, são majoritariamente inibitórios, pois a ligação gabaérgica nestes, estimula a abertura de canais de  $\text{Cl}^-$ , com aumento do influxo desses íons nas células, gerando assim, uma hiperpolarização celular e consequente resposta inibitória. Os receptores gabaérgicos metabotrópicos também possuem efeitos inibitórios e podem agir na ativação de canais de  $\text{K}^+$  ou bloqueando canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , promovendo hiperpolarização da membrana celular (OLSEN; DELOREY, 2015).

Apesar de serem aminoácidos com ações neurotransmissoras antagônicas, recentemente foi observado que tanto células glutamatérgicas quanto GABAérgicas podem apresentar produção de ambos os neurotransmissores, mecanismo observado principalmente

em neurônios presentes no giro denteado (MÜNSTER-WANDOWSKI; GÓMEZ-LIRA; GUTIÉRREZ, 2013).

A dopamina, um neurotransmissor do grupo das monoaminas, a síntese dopaminérgica se dá a partir de duas reações enzimáticas, a primeira consiste da formação do precursor dopaminérgico DOPA, formado a partir da hidroxilação da Tirosina. DOPA então é descarboxilada pela ação da enzima DOPA-descarboxilase, sendo então a dopamina, produto dessa reação. Os Neurônios dopaminérgicos estão localizados principalmente na área tegmental ventral no mesencéfalo, com fibras nervosas que se direcionam ao nucleus accumbens e o núcleo amigdalóide, estruturas que compõem o sistema límbico (CHINTA; ANDERSEN, 2005).

Após sintetizada, a dopamina é estocada em vesículas pela ação de um transportador vesicular de monoaminas (TVMA). O estímulo gerado a partir de um potencial de ação faz com que ocorra o influxo de  $Ca^{2+}$  pelo terminal axônico, promovendo assim a fusão das vesículas e consequente liberação da dopamina na fenda sináptica, aonde irá agir sobre seus receptores. Os receptores dopaminérgicos são receptores membros da família de receptores acoplados a proteína G, sendo denominado de  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$  e  $D_5$ . Os receptores  $D_1$  e  $D_5$  agem ativando a Adenilciclase via Proteína  $G_s$ , consequentemente aumentando os níveis intracelulares de AMPc. Já os receptores  $D_2$ ,  $D_3$  e  $D_4$ , inibem a adenilciclase via proteína  $G_i$  (BHATIA; SAADABADI, 2019; VALENZUELA; PH; MICHAEL, 2001).

A recaptação de dopamina é executada a partir dos terminais axônicos e células gliais, mediada por um transportador de dopamina  $Na^+$  dependente (TDA). Seu catabolismo é efetuado pelas enzimas monoamina oxidase (MAO), uma enzima mitocondrial, e pela catecol-O-Metiltransferase (COMT), sendo formado o ácido acético-dihidroxifenil (DOPAC) pela ação da oxidase MAO, sobre a dopamina, e a metoxitiramina (3-MT) pela ação da metiltransferase COMT, sendo DOPAC e 3-MT os metabólitos primários do catabolismo dopaminérgico. Esses metabólitos por sua vez, sofrem ações das enzimas MAO e COMT, já citadas, tendo a MAO ação de oxirredução sobre a 3-MT, e a COMT, age metilando o DOPAC, ambas as reações geram um metabólito final em comum, denominado ácido monovanílico (HVA) (BURKE et al., 2004; NISSINEN; MÄNNISTÖ, 2010; VALENZUELA; PH; MICHAEL, 2001).

Os neurônios dopaminérgicos estão presentes na maioria das regiões cerebrais, incluindo o córtex, hipocampo e o corpo estriado. A dopamina presente em cérebros adultos regula movimentos corporais, atenção, motivação, reforço, satisfação e recompensa. No hipocampo, essa monoamina afeta reações neurais relacionadas a plasticidade, como a formação de memórias de situações não usuais, que não estão presentes no cotidiano.

Recentemente, além das fontes de liberação de dopamina no hipocampo através da via mesolímbica, foi observado uma liberação dopaminérgica advinda das fibras noradrenérgicas presentes no Locus Cerúleo, relacionada a formação de memória no hipocampo (KENTROS et al., 2004; LISMAN; GRACE, 2005; MCNAMARA et al., 2014; ROSEN; CHEUNG; SIEGELBAUM, 2015).

A taurina é um aminoácido semi-essencial, intracelular, sendo sintetizada principalmente nos rins e no fígado, como produto final da série de uma série de reações enzimáticas sofridas pela cisteína, que é oxidada pela enzima cisteína dioxigenase, (CDO), formando-se o cisteinosulfinato como produto dessa reação, é descarboxilado pela cisteinosulfinato descarboxilase, formando a hipotaurina, essa, por fim, sofre oxiredução por ação da hipotaurina desidrogenase e é então sintetizada a taurina. A taurina, apesar de ter sua síntese principalmente hepática, é encontrada em todos os tecidos de mamíferos, incluindo o tecido cerebral (JAKARIA et al., 2019; SCHAFFER; LOMBARDINI; HUXTABLE, 1998).

A presença de um grupamento sulfônico (-SO<sub>3</sub>) na taurina, é um fator que o torna diferente em estrutura dos demais aminoácidos de modo geral, uma vez que nestes, é observada a presença de um grupamento carboxílico (COOH). Apesar de não participar da síntese proteica, a taurina é crucial em processos biológicos, como o desenvolvimento do sistema nervoso e em mecanismos imunológicos, aonde atua reduzindo o estresse oxidativo e com repercussão anti-inflamatória (SCHAFFER; LOMBARDINI; HUXTABLE, 1998).

A taurina sofre exocitose a partir de um acúmulo de íons K<sup>+</sup> no meio extracelular. Já externalizada, a taurina pode agir inibindo o disparo neuronal através da sua ligação a receptores de GABA e glicina. No entanto, a existência de receptores específicos de taurina ainda é uma incógnita (LEE et al., 2010; OJA; SARANSAARI, 2017).

#### ***1.4.2 Ação do MeHg sobre o Hipocampo***

O MeHg pode ser transportado através da barreira hematoencefálica assim como através da barreira placentária, o que torna a exposição a esse composto um risco para a saúde tanto de indivíduos já formados, quanto para mães e sua prole mesmo em período gestacional, com consequências que podem durar mesmo após o nascimento, principalmente com danos documentados no hipocampo e funções psicossociais relacionadas a essa estrutura (JACOB; SUMATHI, 2019; JACOB; THANGARAJAN, 2018).

É reportado na literatura diferentes efeitos do MeHg sobre o hipocampo, sendo

efeitos dependentes de idade, dose, tempo de exposição. Algumas características comuns são, redução da população hipocampal de neurônios, com um aumento da expressão de proteína glial fibrilar ácida (do inglês, *glial fibrillary acidic protein* - GFAP) em filhotes neonatos, enquanto há a redução de células GFAP-positivas em ratos adultos. É reportado que mesmo em pequenas doses, astrócitos e neurônios hipocampais se mostram sensíveis a citotoxicidade promovida pelo MeHg (BITTENCOURT et al., 2019; HEIMFARTH et al., 2018).

O GFAP, um marcador astrocitário, é um filamento intermediário responsável pela força mecânica e forma nos astrócitos. O aumento do GFAP pela exposição ao MeHg indica uma possível reatividade astrocitária ou astrogliose no tecido hipocampal (JACOB; SUMATHI, 2019).

Também é observada uma *downregulation* de BDNF pela exposição ao MeHg hipocampo de ratos. No hipocampo, o BDNF liberado pelos astrócitos tem um importante papel na plasticidade sináptica, pela sua participação na promoção de potenciais de longa duração, que são o alicerce da consolidação de memórias e aprendizado (ANDERSSON; LINDQVIST; OLSON, 1997; JACOB; SUMATHI, 2019).

A exposição ao MeHg também promoveu uma *downregulation* nas proteínas neurogranina e dendrina em hipocampo de ratos neonatos. A neurogranina é uma proteína predominantemente expressa no corpo celular, espinha dendrítica e dendritos de células hipocampais. Se liga a calmodulina e regula a avaliabilidade desta para a sinalização de  $Ca^{2+}$  nos neurônios, com isso possuindo um papel crítico na regulação da plasticidade sináptica e formação de sinais de memória e aprendizado no hipocampo. Já a dendrina é traduzida a partir do RNAm somatodendrítico e se agrupa nas espinhas dendríticas. Essa proteína modula o citoesqueleto da célula pós-sináptica em termos de estrutura e função, o que é crucial para a plasticidade sináptica e formação de memória (CHANG et al., 1997; DÍEZ-GUERRA, 2010; HERB et al., 1997; JACOB; SUMATHI, 2019; NEUNER-JEHLE et al., 1996; RANDALL SLEMMON; FENG; ERHARDT, 2001).

Além disso, a exposição ao MeHg, é capaz de induzir um aumento na expressão de caspase 3 no hipocampo de proles de rato, assim como o aumento da liberação de citocromo C, e produção de nitrito, tanto em filhotes quanto em ratos adultos, o que demonstra a existência de um pronunciado aumento no estresse oxidativo, e possível ativação de vias apoptóticas (JACOB; SUMATHI, 2019; LEÃO et al., 2017).

Entre os efeitos neurocomportamentais relacionados ao hipocampo estão, dificuldade de aprendizado, e memória deficitária dentre as quais, reduzida memória social factual, memória espacial de longa duração e capacidade de aprendizado, o que corrobora com

os achados em relação a função e morfologia hipocampal (BITTENCOURT et al., 2019; HEIMFARTH et al., 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os estudos sobre intoxicação por metilmercúrio vêm crescendo consideravelmente no Brasil. Desastres relacionados a Hg e outros metais pesados podem aumentar a exposição da população ao MeHg, com significativo potencial neurotóxico (BASTA; HACON, 2020; DE FREITAS et al., 2019; THOMPSON et al., 2020).

Estudos recentes mostraram que a exposição ao MeHg de forma crônica, pode levar a perda de memória, doenças neurológicas, distúrbios motores e a um aumento pronunciado de risco cardiovascular (ATTOFF et al., 2017; EDOFF et al., 2017; LEOCÁDIO et al., 2020).

Apesar do efeito neurotóxico do MeHg no SNC ser bem conhecido, pouco se sabe a respeito do efeito do metilmercúrio na atividade neuroquímica de neurotransmissores no hipocampo, uma região de alta plasticidade do SNC, envolvido com memória e aprendizagem em camundongos jovens. O presente estudo visa avaliar as alterações dos níveis de aminoácidos e monoaminas, estresse oxidativo e eventos inflamatórios promovidos pela exposição ao MeHg no hipocampo de camundongos C57BL/6 jovens. Resultados deste estudo podem ajudar a compreender eventos precoces da intoxicação mercurial e sua associação com déficits cognitivos no adulto e risco para doenças neurodegenerativas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- O presente estudo avaliou o efeito da intoxicação crônica por MeHg sobre os biomarcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e dosagem de aminoácido e monoaminas no hipocampo de camundongos C57BL/6J jovens.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar as concentrações de MeHg no pelo de camundongos C57BL6/J expostos à intoxicação mercurial, para confirmar a exposição crônica.
- Monitorar o ganho de peso corporal de camundongos C57BL6/J expostos à intoxicação mercurial e controles.
- Avaliar o estresse oxidativo a partir dos níveis de glutathiona e malondialdeido no hipocampo de camundongos C57BL6/J, após intoxicação mercurial e controles.
- Avaliar as concentrações de mieloperoxidase (MPO) no hipocampo de camundongos C57BL6/J, após intoxicação mercurial e controles.
- Analisar os níveis da monoamina dopamina e seu metabólito ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no hipocampo de camundongos C57BL6/J, após intoxicação mercurial e controles.
- Investigar as concentrações de aminoácidos (glutamato, glicina, tirosina, taurina e ácido gama-aminobutírico) no hipocampo de camundongos C57BL6/J, após intoxicação mercurial e controles.

## 4 MATERIAS E MÉTODO

### 4.1 Animais

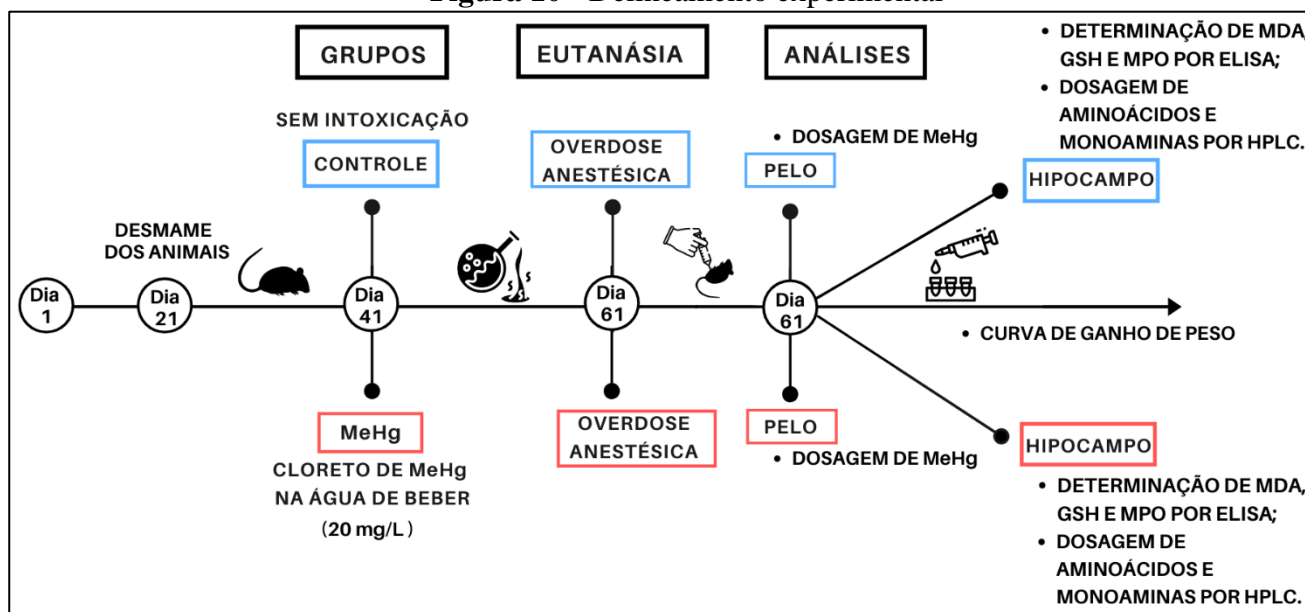
Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J jovens, com idade de 41 dias e peso entre 14-16 gramas. Os mesmos foram provenientes do biotério de produção do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e mantidos sob rigoroso controle sanitário. Esses animais foram mantidos em microisoladores (Alesco®) em racks com sistema automático de ventilação, filtragem do ar e controle de luz, com livre acesso a ração e água. Os mesmos permaneceram em temperatura controlada de 22°C. Todos os procedimentos foram realizados em biotério *Specified Pathogen Free* (SPF), com Nível de Biossegurança 1. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidado Animal da Universidade de Fortaleza, com parecer de nº 015/2015 (**Anexo**).

### 4.2 Delineamento Experimental

No 21º dia de vida ocorreu o desmame dos animais. No 41º dia, iniciou-se o protocolo de intoxicação, com a distribuição dos animais em dois grupos: - Grupo Controle: animais, com livre acesso à ração e água sem intoxicação; - Grupo MeHg: animais intoxicados, com livre acesso à ração e água com solução de cloreto de MeHg (20 mg/L) (Sigma®, Darmstadt, Alemanha) (**Figura 10**).



**Figura 10 - Delineamento experimental**



Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.1 Protocolo de Intoxicação mercurial

Os animais do grupo MeHg, receberam durante 20 dias diariamente uma solução de cloreto de MeHg na água de beber (20 mg/L) (Sigma®, Darmstadt, Alemanha) (no período pós-natal do dia 41 ao dia 61) (LEOCÁDIO et al., 2020). Os animais apresentaram um consumo médio de água de aproximadamente 6 ml/dia, considerando que cada animal atingiu o peso médio de 15 gramas ao final do experimento, chegamos ao consumo total de 84 mg/Kg ou 4 mg/Kg/dia.

#### 4.2.2 Eutanásia e coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados ao completar 20 dias de intoxicação (61 dias de vida pós-natal), submetidos à overdose anestésica de cetamina/xilazina, e em seguida realizada a coleta das amostras. Todo o tecido hipocámpal foi cuidadosamente removido, sendo rapidamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realização das análises. A coleta dos pelos foi realizado na região dorsal do animal, após a eutanásia para dosagem de metilmercúrio.

### 4.3 Manejo e descarte do material intoxicado por MeHg

Os animais expostos ao cloreto de MeHg permaneceram por todo tempo em microisoladores devidamente identificados com adesivos contendo o símbolo de material contaminante, risco biológico e o diagrama de Hommel (**Figura 11**) e com suas devidas mamadeiras separadas para esse fim.

**Figura 11** - Microisoladores com símbolos de risco biológico e o diagrama de Hommel



**Fonte:** Adaptado de Pinto, 2018.

Toda manipulação dos animais foi feita com materiais de proteção individual (EPIs), incluindo máscaras, luvas, gorros, aventais. Os EPIs foram descartados após serem utilizados em sacos identificados como risco biológico e foram enviados para empresa especializada para tratamento do material contaminado (incineração).

Os microisoladores contaminados foram limpos em água corrente por técnicos treinados portando os EPIs necessários. O descarte da maravalha contaminada foi feito em saco com a identificação de risco biológico e enviada para incineração, visto que parte pequena do MeHg é excretada pela urina e fezes. O descarte das carcaças dos animais foi feito envolvendo-as em papel alumínio e colocando-as em sacos com identificação de risco biológico, sendo enviadas para empresa especializada para tratamento do material contaminado (incineração). Até o envio, as carcaças em saco plástico com identificação de risco biológico foram armazenadas em freezer para esse fim.

O preparo da solução de MeHg foi realizada em cabine de segurança com exaustor. 20mg de cloreto de MeHg foram diluídos por litro de água comum filtrada para administração

aos animais. O produto foi pesado em balança analítica dentro da cabine de biossegurança. A solução de cloreto de MeHg (20 mg/L) foi armazenada em container com tampa de fluoropolímero. O MeHg foi pesado em balança analítica utilizando papel de filtro.

A administração da solução de MeHg em mamadeiras envolvidas com papel alumínio foi feita para os animais do 41º ao 61º dia, ad libitum. A troca da solução de MeHg foi feita semanalmente. A água contaminada residual das mamadeiras foi armazenada em recipientes de plástico, identificados com o diagrama de Hommel e o símbolo de risco biológico e armazenados e protegidos em lugar reservado e de acesso controlado (BRASIL, 2018).

#### **4.4 Porcentagem de ganho de peso**

Os animais foram pesados em dias alternados com intervalo de 72h, sempre no período da manhã, durante o protocolo experimental do 4º ao 61º dia, sendo ao total 18 dias de pesagem. Ao final foi calculado a porcentagem de ganho de peso entre o grupo controle e o grupo intoxicado.

#### **4.5 Dosagem de Metilmercúrio no pelo**

Para obtenção dos pelos, foi feita tricotomia da região lombar dos animais através do uso de lâmina de bisturi. Cuidadosamente utilizando uma pinça, o material foi obtido e armazenado em recipientes de vidro de borossilicato, cor âmbar, com tampas contendo batoques feitos a partir de depolitetrafluorretileno, garantindo a não evaporação do produto (EPA, 1998). Os frascos foram sinalizados com uma etiqueta azul contendo as precauções e cuidados com o contato da pele, olhos, roupas e inalação, bem como instruções sobre a ventilação adequada (EPA, 1998; KASPER et al., 2014).

Após a coleta do material e armazenagem, o material foi enviado para o departamento de química da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, para ser submetido ao método de espectrofotometria de absorção atômica. As vidrarias utilizadas nos procedimentos analíticos foram previamente mantidas em solução de HNO<sub>3</sub> 10%, por 24 h, KMnO<sub>4</sub> em solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NH<sub>2</sub>OH HCl a 10%, lavados com água corrente, e posteriormente lavados com água destilada e deionizada em sistema Milli-Q e secos em estufa a temperatura de 50°C.

As determinações de Hg total nas amostras foram realizadas de acordo com o método analítico proposto por Akagi, Malm e Branches (1996), sendo descrito resumidamente a seguir: amostras foram pesadas e acondicionadas em frascos de digestão de aproximadamente 50 mL. Em seguida, foram adicionados 2 mL de HNO<sub>3</sub> + HClO<sub>4</sub> (1:1), 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mL de H<sub>2</sub>O deionizada. Após agitação, os frascos de digestão foram levados à chapa aquecedora a temperatura de 222 ° C durante 20 minutos. Em seguida, as soluções foram resfriadas a temperatura ambiente, transferidas para balão volumétrico de 50 mL, aferidas e homogeneizadas com água. Na realização das análises foram utilizados reagentes da marca Merck. As determinações de Hg<sup>2+</sup> nas amostras foram feitas por espectrofotometria de absorção atômica com sistema de geração de vapor a frio, utilizando-se analisador direto de mercúrio (MASCARENHAS et al., 2004).

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM), sendo comparados os valores de concentração de mercúrio dos animais expostos aos dos animais controles (não intoxicados)

#### **4.6 Avaliação de Estresse Oxidativo em amostras de hipocampo**

##### ***4.6.1 Determinação de glutathiona – GSH***

A glutathiona reduzida (GSH) é uma molécula não proteica que tem como principal papel, sua ação antioxidante, sendo essencial na proteção das células contra o estresse oxidativo e na multiplicação dos linfócitos (JÚNIOR et al., 2001).

A determinação dos níveis de grupamentos sulfidrila não proteicas (NP-SHs) foi determinado pelo método que utiliza o reagente de Ellman's, o ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Para isso, as amostras de hipocampo foram pesadas e homogeneizadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético gelado (EDTA, 0,02 M; pH 8,9), em 10% de proporção, com auxílio do homogeneizador de tecidos, 40 µL do homogenato foram misturados com 50 µL de água destilada, mais 10 µL de ácido tricloroacético (TCA, 50%) e centrifugados à 5000 rpm por 15 minutos, à 4 °C.

O sobrenadante obtido foi pipetado em placa de 96 poços com tampão Trizma (0,4 M) mais EDTA (0,02 M, pH 8,9) e DTNB (0,01 M). A absorbância foi mensurada em leitor de microplaca, dentro de 5 minutos depois da adição de DTNB, em comprimento de onda de 412

nm. Os valores das absorvâncias foram interpolados a curva padrão de glutathiona e os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  de NP-SH por miligrama de proteína ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína).

#### **4.6.2 Determinação de Malondialdeído - MDA**

A presença de estresse oxidativo tem como alvo o ataque aos ácidos graxos dos lipídios da membrana, terminando com a quebra de lipídeo peroxidado, produção do metabólito Malondialdeído (MDA) e outros produtos (GOMES, 2006).

As amostras de hipocampo foram removidas, pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio gelado (0,1 M, pH = 7,0), com homogeneizador de tecido na proporção de 10%. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram misturadas com ácido acético 20% e ácido 2-tiobarbitúrico 0,5% (diluído em ácido acético 20%, pH 2,4 - 2,6). A mistura foi transferida para o banho-maria com temperatura de 95°C, onde ficou durante 1 hora, a amostra foi homogeneizada a cada 15 minutos e sequencialmente para o banho de gelo onde ficou durante 30 minutos. Em seguida recebeu dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%) e foi imediatamente centrifugada a 12.000 rpm, durante 15 minutos, a 25 °C. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda em 532 nm. A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em nanomols de MDA por miligrama de proteína (nmol/mg de proteína).

### **4.7 Avaliação da Mieloperoxidase - MPO em amostras de hipocampo**

#### **4.7.1 Imunoensaio de Mieloperoxidase – MPO**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima produzida por células imunes, dentre as quais, suas principais produtoras são os neutrófilos, sendo armazenada nos grânulos primários ou azurófilos (KLEBANOFF, 2005), o que permite estimar a sua infiltração no foco inflamatório por dosagem da sua atividade (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010), uma vez que as concentrações teciduais da MPO estão relacionadas com o número de neutrófilos no tecido estudado (GENOVESE et al., 2006) A partir disto, é comum sua utilização como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos.

O ensaio foi feito de acordo com as instruções do Kit Mouse Mouse DuoSet ELISA AF3667 (R&D systems). As amostras de hipocampo que foram diluídas em tampão RIPA para realizar a quantificação de proteínas foram novamente diluídas no reagente diluente (RD) específico do kit em uso, sendo usada a proporção de 1:1 (ex: 50  $\mu$ L de amostra e 50  $\mu$ L de RD) e armazenados sob refrigeração (- 4°C).

Foram utilizadas placas para ELISA de 96 poços. Inicialmente os poços foram preenchidos 100  $\mu$ L do anticorpo de captura e ficaram overnight à temperatura ambiente (TA). Seguiu-se à lavagem da placa, pondo tampão de lavagem do próprio kit, 200  $\mu$ L por poço, e em seguida a secagem da placa impondo uma força sobre uma superfície plana revestida com papel com propriedades absorventes (todo o processo de lavagem foi repetido por três vezes). Logo após foi feito o bloqueio de cada poço com 250  $\mu$ L de RD e a placa foi deixada em repouso por 1 hora em TA.

Após essa etapa foi realizado novo processo de lavagem e em seguida adicionadas amostras e curva padrão, 100  $\mu$ L em cada poço (mantidos em repouso por 2 h em TA). Após essa etapa foi feita outra etapa de lavagem e adicionado 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção em cada poço (mantido por 2 h em TA), precedido de outra etapa de lavagem. Logo após foi adicionado a streptavidina HRP (100  $\mu$ L) e foi mantido por 20 minutos em TA, protegido da luz. Após mais um procedimento de lavagem foi feita a junção de uma parte de CRA com 1 parte de CRB, na proporção de 1:1, totalizando-se um volume de 100  $\mu$ L da solução CRA e CRB em cada poço, mantendo-se a placa em repouso por 30 minutos, TA, protegida da luz. Ao final, foi adicionado 50  $\mu$ L de solução de parada e realizada uma leve agitação, seguida de leitura imediata em 450 a 540 nm. Os resultados foram expressos em picograma por mg de proteínas (pg/mg de proteínas).

#### **4.8 Dosagem de Monoaminas e Aminoácidos em amostras de hipocampo**

Monoaminas são moléculas derivadas da descarboxilação de aminoácidos, sendo compostos lábeis, com determinação tecidual influenciada por uma série de variáveis pré-analíticas. Níveis elevados de monoaminas também são encontradas no trauma, pós-operatórios, frio, ansiedade, suspensão de clonidina e doenças graves intercorrentes.

Para a detecção dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) da WATERS modelo Alliance por detecção

eletroquímica e os níveis de aminoácidos por detecção fluorescência. Os hipocampus foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO<sub>4</sub> à 1%) por aproximadamente 30 segundos e o homogenato foi colocado em tubos Eppendorf de 2 mL para centrifugação por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 14000 rpm.

Uma alíquota de 20uL do sobrenadante foi então injetada no equipamento de HPLC para serem analisadas. Para as análises de monoaminas foi utilizada uma coluna Symetry® C18 com comprimento de 150mm, calibre 4,6cm e diâmetro da partícula de 5,0um, da WATERS. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido crítico 0,163M, pH 3,5 contendo ácido octanosulfônico sódico 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7%v/v. Dopamina (DA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT), ácido hidroxindolacético (5-HIAA) e noradrenalina (NE) serão eletroquimicamente detectados usando-se um detector amperométrico.

Aminoácidos como glutamato, glicina, tirosina, taurina e GABA, foram quantificados por detector fluorescência seguindo as seguintes condições cromatográficas: A fase móvel foi composta por Tampão fosfato de sódio 50 mM e metanol 20% v/v ( Fase A) e Metanol (Fase B), em fluxo de 1 ml/min. Foi utilizada uma coluna LUNA® C18 com comprimento de 25cm, calibre 4,6cm e diâmetro da partícula de 5um, da Phenomenex. Nas amostras foi utilizada para detecção fluorescência uma alíquota de reagente de derivatização na proporção de 1:1 composto por: o-phthaldialdeido, Etanol, 2-mercapetanol e tampão borato.

#### **4.9 Análise estatística**

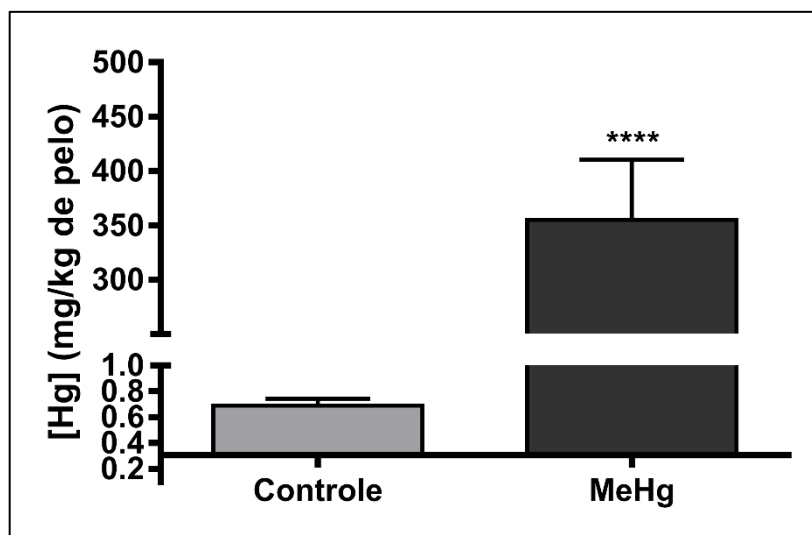
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste *T* de Student não pareado foi utilizado para comparar os grupos. Na análise de ganho de peso foi utilizado o teste Two-way ANOVA. Para indicar diferenças significativas foi utilizado valor de  $p < 0,05$ . Para construção dos gráficos e análise estatística foi utilizado o programa Graph Pad Prism (GraphPad Prism 7 Software, San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise da concentração de MeHg por kg de pelo

Após a exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber durante um período de 20 dias, foi observado um aumento significativo nos níveis de Hg no pelo, onde o grupo MeHg alcançou ( $355 \pm 55,4$  mg/Kg) (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), quando comparado ao grupo C ( $0,69 \pm 0,05$  mg/Kg) (Figura 12).

Figura 12 - Concentração de MeHg por kg de pelo

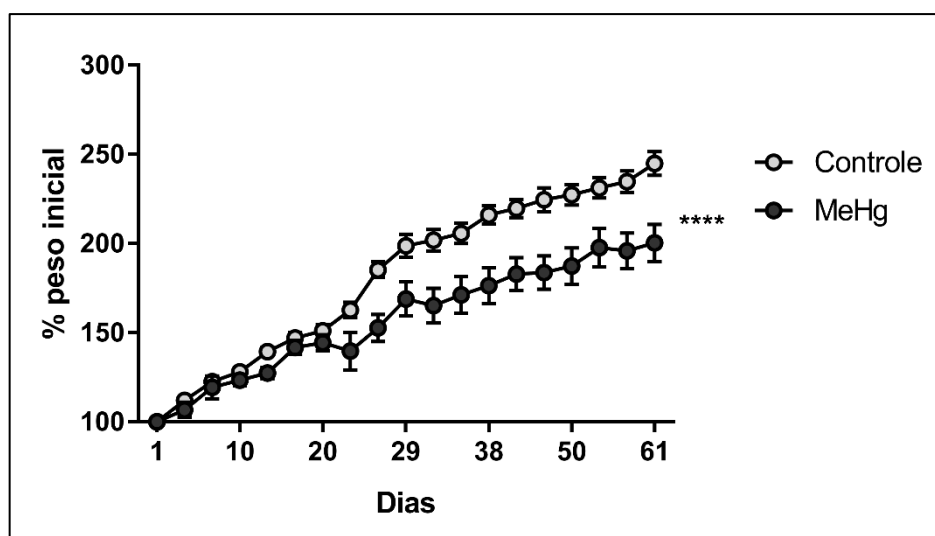


Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM, de 6 animais no grupo Controle e 6 animais no grupo MeHg, com o \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (teste *T* de *Student* não pareado).

### 5.2 Percentual de ganho peso dos grupos experimentais

Após a exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber durante um período de 20 dias, os animais do grupo MeHg, ( $200 \pm 23,3\%$ ) apresentaram menor ganho de peso (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) quando comparados aos animais do grupo Controle ( $244, \pm 14,8\%$ ) (Figura 13).



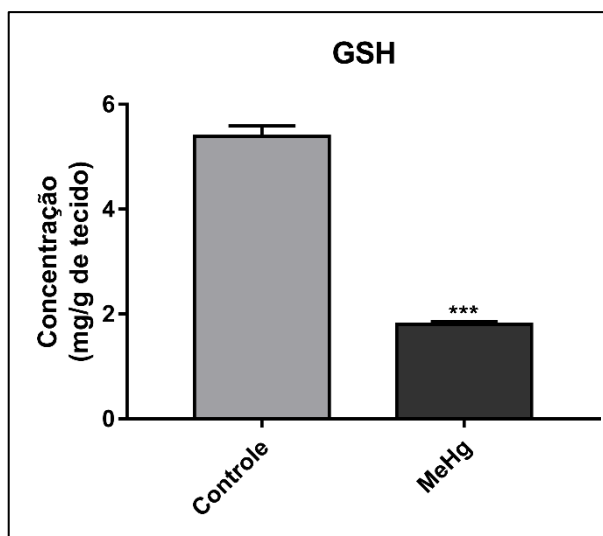
**Figura 13** – Percentual de ganho de peso dos grupos experimentais

Os valores foram expressos em % do valor de peso inicial e média  $\pm$  EPM, de 5 animais no grupo Controle e 5 animais no grupo MeHg, com o \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (teste Two-way ANOVA).

### 5.3 Análise de Estresse Oxidativo no hipocampo

#### 5.3.1 Dosagem de glutathiona reduzida (GSH)

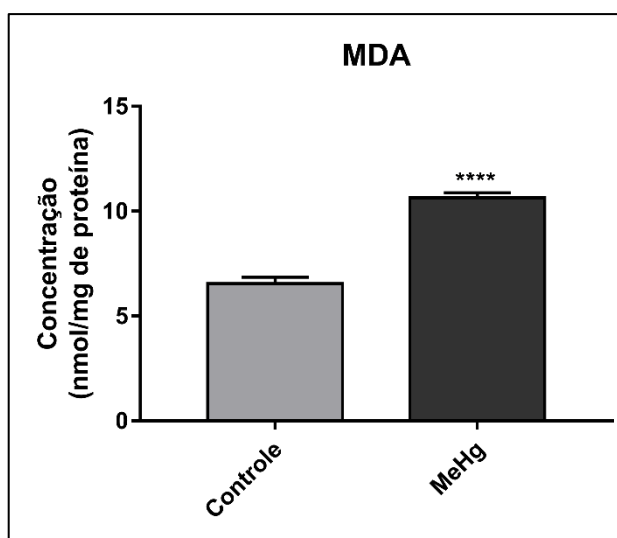
Os animais expostos à dose de 20mg/L de MeHg na água beber durante um período de 20 dias, demonstraram uma redução significativa na concentração de GSH nas amostras de hipocampo ( $1,801 \pm 0,060$ ) (\*\*\*)  $p < 0,0005$ ) quando comparadas as amostras do grupo Controle ( $5,386 \pm 0,21$ ) (**Figura 14**).

**Figura 14** – Dosagem de GSH em amostras de hipocampo

Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 11 animais no grupo Controle e 11 animais no grupo MeHg, com o \*\*\*  $p < 0,0005$  (teste T de Student não pareado).

### 5.3.2 Dosagem de malondialdeído (MDA)

Após 20 dias de exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber, as concentrações de MDA aumentaram significativamente no grupo MeHg ( $10,65 \pm 0,23$ ) (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo Controle ( $6,54 \pm 0,30$ ) (**Figura 15**).

**Figura 15** – Dosagem de MDA em amostras de hipocampo

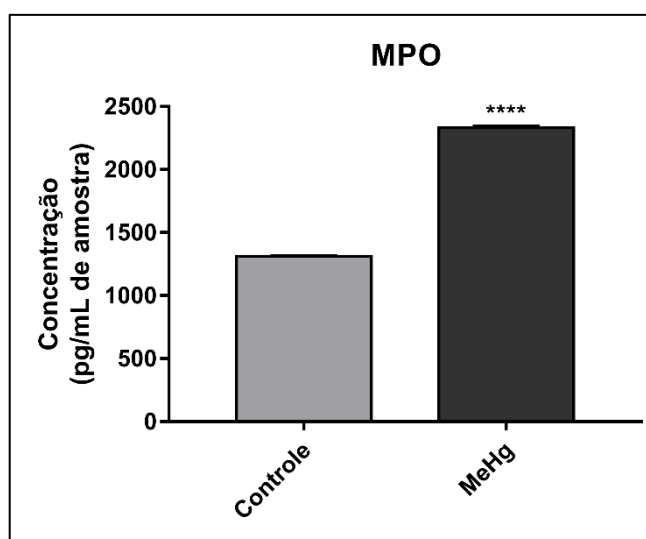
Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 11 animais no grupo Controle e 11 animais no grupo MeHg, com o \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (teste T de Student não pareado).

## 5.4 Avaliação das concentrações de MPO no hipocampo

### 5.4.1 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

Após 20 dias de exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber, constatou-se diferença significativa na concentração da MPO entre os grupos, com um aumento no grupo MeHg ( $2333 \pm 10,6$ ) (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo Controle ( $1312 \pm 5,92$ ) (**Figura 16**).

**Figura 16** - Avaliação da concentração de MPO em hipocampo



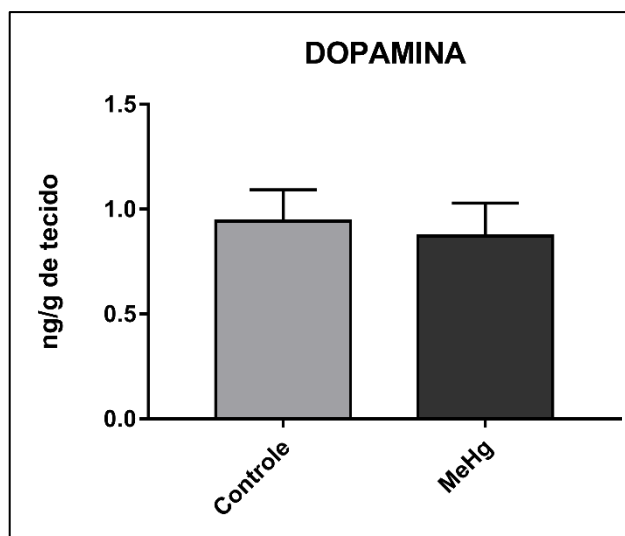
Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 19 animais no grupo Controle) e 19 animais no grupo MeHg, com o \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (teste T de Student não pareado).

## 5.5 Análise de Monoaminas no hipocampo

### 5.5.1 Dosagem de dopamina (DA)

Após à exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber, por 20 dias, as concentrações de dopamina dosadas no hipocampo não demonstraram diferença significantes entre os grupos (**Figura 17**).

**Figura 17** - Análise da concentração de DA em hipocampo de camundogos C57BL/6

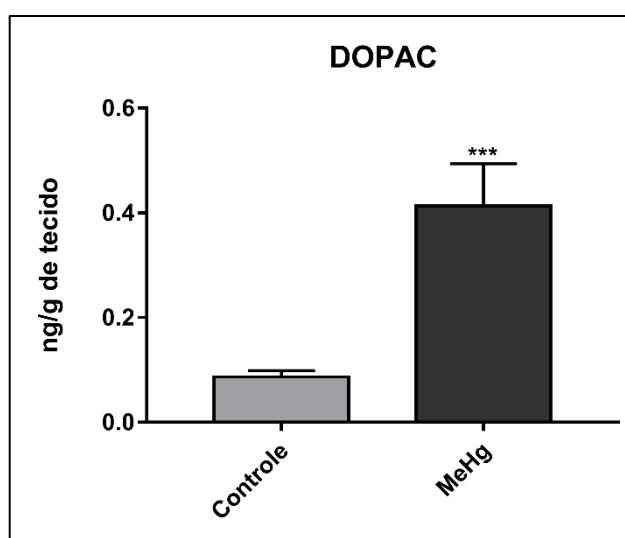


Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 8 animais no grupo Controle e 8 animais no grupo MeHg, sem valores significativos (teste T de Student não pareado).

### 5.5.2 Dosagem de Ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC)

Posteriormente a exposição dos animais a dose de 20mg/L de MeHg na água de beber por 20 dias, foi observado um aumento significativo na análise de DOPAC nas amostras de hipocampo do grupo MeHg ( $0,41 \pm 0,081$ ) (\*\*\*) ( $p < 0,0003$ ) em relação as amostras do grupo Controle ( $0,08 \pm 0,012$ ) (**Figura 18**).

**Figura 18** - Análise da concentração de DOPAC em hipocampo de camundogos C57BL/6



Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 8 animais no grupo Controle e 8 animais no grupo MeHg, com

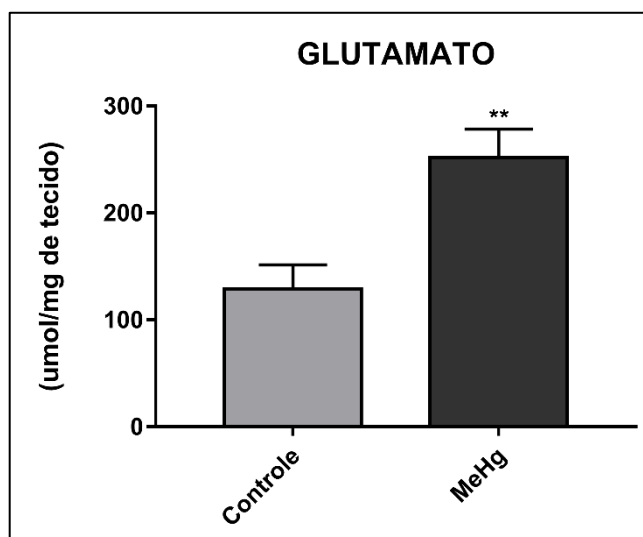
o \*\*\*  $p < 0,0003$  (teste T de Student não pareado).

## 5.6 Análise de Aminoácidos no hipocampo

### 5.6.1 Dosagem de glutamato

Posteriormente a exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber por 20 dias, foi observado um aumento significativo nos níveis de glutamato das amostras de hipocampo do grupo MeHg ( $251,9 \pm 26,68$ ) (\*\*  $p < 0,003$ ) quando comparados as amostras do grupo Controle ( $129,1 \pm 22,48$ ) (**Figura 19**).

**Figura 19** - Análise da concentração de glutamato em hipocampo de camundogos C57BL/6

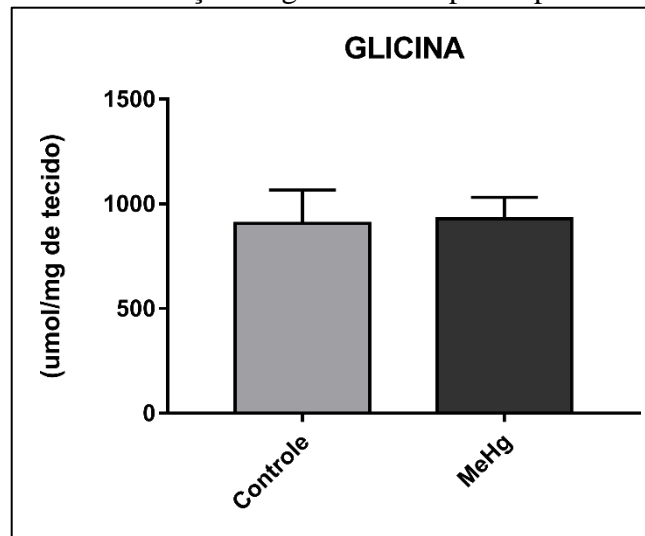


Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 8 animais no grupo Controle e 8 animais no grupo MeHg, com o \*\*  $p < 0,003$  (teste T de Student não pareado).

### 5.6.2 Dosagem de glicina

Após a exposição dos animais a dose de 20mg/L de MeHg na água de beber durante um período 20 dias, não houve diferença significantes entre os grupos, em relação as concentrações de glicina dosadas no hipocampo (**Figura 20**).

**Figura 20** - Análise da concentração de glicina em hipocampo de camundogos C57BL/6

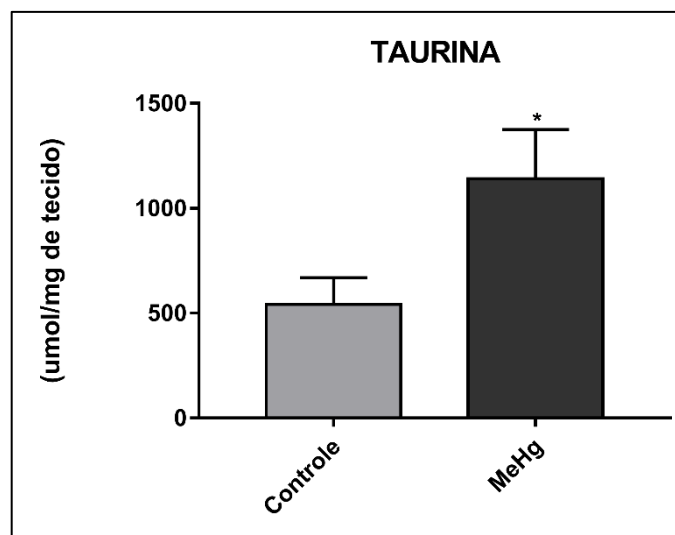


Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM de 10 animais no grupo Controle e 11 animais no grupo MeHg, sem valores significativos (teste T de Student não pareado).

### 5.6.3 Dosagem de Taurina

Após 20 dias de exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber, os níveis de taurina aumentaram nas amostras de hipocampo do grupo MeHg ( $1141 \pm 234$ ) (\*  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Controle ( $542,5 \pm 126,7$ ) (**Figura 21**).

**Figura 21** - Análise da concentração de taurina em hipocampo de camundogos C57BL/6

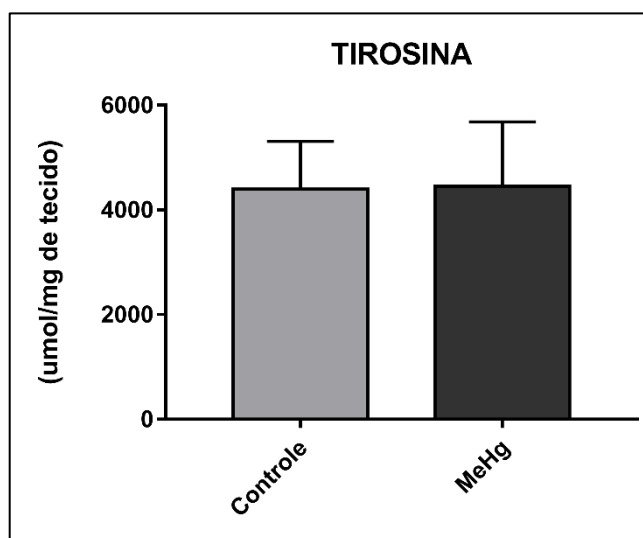


Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM de 8 animais no grupo Controle e 9 animais no grupo MeHg, com o \*  $p < 0,05$  (teste T de Student não pareado).

#### 5.6.4 Dosagem de tirosina

Posteriormente exposição dos animais à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber durante um período 20 dias, não foi observada diferença significantes entre os grupos, em relação as concentrações de tirosina dosadas no hipocampo (**Figura 22**).

**Figura 22** - Análise da concentração de tirosina em hipocampo de camundogos C57BL/6

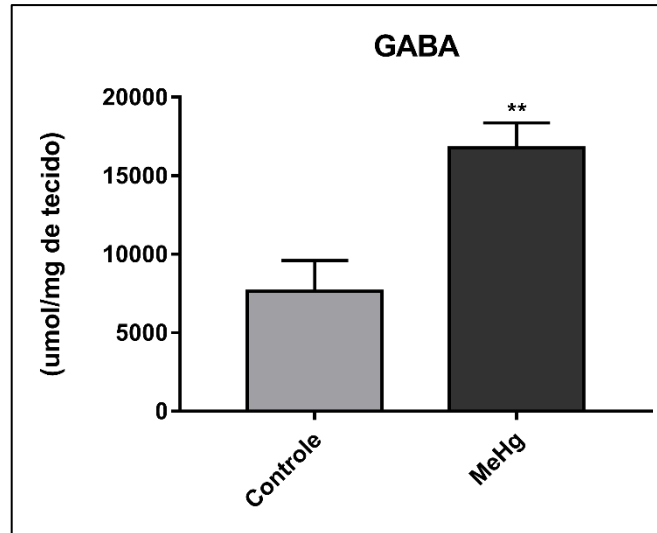


Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 9 animais no grupo Controle e 8 animais no grupo MeHg, sem valores significativos (teste T de Student não pareado).

#### 5.6.5 Dosagem de GABA

Após 20 dias de exposição à dose de 20mg/L de MeHg na água de beber, observou-se um aumento significativo na concentração de GABA no hipocampo grupo MeHg ( $16775 \pm 1592$ ) (\*\*  $p < 0,002$ ) em comparação ao grupo Controle ( $7642 \pm 1964$ ) (**Figura 23**).

**Figura 23** - Análise da concentração de GABA em hipocampo de camundogos C57BL/6



Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM de 8 animais no grupo Controle e 9 animais no grupo MeHg, com o  $** p < 0,002$  (teste T de Student não pareado).



## 6 DISCUSSÃO

Como exposto anteriormente, os impactos do Hg enquanto agente intoxicante, tem cada vez mais sido evidenciados, uma vez que, não só no Brasil, como em todo o mundo se torna cada vez mais públicas as situações em garimpos e minas, que acarretam danos ao bioma no qual estão inseridos, principalmente através do despejo de rejeitos, deste modo, expondo o Hg a um ciclo que culmina na produção do MeHg pelo metabolismo bacteriano, intoxicando assim, plantas, peixes e o ser humano.

O MeHg tem seu efeito citotóxico já documentado na literatura, mesmo em baixas doses. Os relatos quanto aos seus efeitos deletérios sobre o sistema nervoso, em situações in vivo, apesar de abundantes, tem um foco em exposições a pequenas doses, ou em curtos espaços de tempo, Principalmente quando avaliados os níveis de neurotransmissores. Havendo uma necessidade de maior elucidação quanto ao caráter neurotóxico exercido pelo MeHg a partir de uma exposição prolongada em altas doses.

O presente estudo utilizou a dose de 20mg/L de MeHg na água de beber de camundongos C57BL/6, por um período de 20 dias, do 41º ao 61º dia de vida (LEOCÁDIO et al., 2020), sendo em seguida feita a eutanásia dos animais e posterior remoção do tecido hipocampal para análise.

Foram avaliados os seguintes aspectos para fins de comparação entre o grupo de animais controle e o grupo intoxicado por MeHg: dosagem de MeHg no pelo dos animais, curva do ganho de peso, análise de marcadores de estresse oxidativo e inflamação, sendo esses, MDA, GSH e MPO, além da quantificação dos neurotransmissores das classes dos aminoácidos e monoaminas hipocampais.

Para avaliação e comprovação da intoxicação mercurial, os animais tiveram o pelo cortado e enviado para análise, sendo observado que o grupo controle apresentou níveis insignificantes de Hg por Kg de Pelo, enquanto os animais do grupo intoxicado apresentaram quase 500 vezes mais Hg presente por kg de pelo. Em humanos, a dosagem dos níveis de Hg no cabelo já é bem estabelecida como um parâmetro para avaliação de intoxicação Mercurial (FEITOSA-SANTANA et al., 2018), sendo o limite indicado de 2mg.kg<sup>-1</sup>, segundo parâmetros de segurança estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003).

A curva de peso dos grupos apresentou uma diferença significativa, com um ganho de peso maior nos animais do grupo controle, em relação ao grupo intoxicado, principalmente

nas 8 pesagens ocorridas entre o 38º dia e o 61º dia (dia do sacrifício). Já é bem relatado na literatura que o MeHg promove um reduzido ganho de peso mesmo em exposições a baixas doses (MAIA, 2009), fato que pode ser explicado pelos fatores estressantes induzidos pelo MeHg no Trato gastrointestinal, como alterações no comportamento da microbiota, com consequentes respostas inflamatórias e aumento de estresse oxidativo (LIN et al., 2020).

No SNC, o MeHg também promove o aumento do estresse oxidativo, assim como reações inflamatórias de modo agudo e crônico, algo já amplamente documentado na literatura, como uma pronunciada elevação na expressão e quantidade de citocinas pró-inflamatórias, assim como a presença de infiltrados neutrofílicos com consequente produção de MPO, depleção das moléculas de GSH, aumento dos níveis de MDA e reduzida atividade da GPx a (FRANCO et al., 2009; FARINA; ASCHNER, 2019).

As moléculas que participam dos mecanismos de estresse oxidativo do MeHg, pela sua característica eletrofílica, estão os já citados grupos de -tiois e -selenois, dentre essas, GSH e GPx por exercerem papéis cruciais como parte do sistema antioxidante relacionado ao ciclo metabólico da Glutathione, sendo recorrente a redução nos níveis de GSH assim como aumento da produção de MDA em estudos que avaliaram intoxicação mercurial in vivo (DOS SANTOS et al., 2018; FARINA; ASCHNER, 2019), no presente trabalho, foram dosados para avaliação do estresse oxidativo provocado por MeHg no hipocampo, os níveis de MPO, MDA e GSH, além da atividade da MPO, para a comprovação da ocorrência de eventos inflamatórios.

Níveis elevados de MPO, enzima presente nos grânulos primários ou azurófilos dos neutrófilos, demonstram a existência de eventos inflamatórios como atividades biológicas pró-aterogênicas, ou a formação acentuada de EROS, uma vez que é uma das moléculas catalizadoras de tal reação (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2008). No presente estudo, foi observado que os níveis de MPO no grupo de animais intoxicado por MeHg foram significativamente mais elevados que os encontrados no grupo controle, o que levar a crer que o MeHg induziu uma atividade inflamatória com infiltrado neutrofílico no tecido hipocampal, dentro do contexto de exposição a altas doses em um período de exposição subcrônico.

O MDA é um dos mais clássicos marcadores de estresse oxidativos, por ser o produto secundário da peroxidação lipídica mais conhecido (GROTTO et al., 2008), no presente estudo, a exposição ao MeHg pela água de beber promoveu um aumento significativo nos níveis de MDA hipocampais em comparação aos animais do grupo controle, o que sugere ter havido

um aumento da peroxidação lipídica no tecido hipocampal, induzido pela ação neurotóxica do MeHg.

Na dosagem de GSH, foi observado uma diferença significativa entre os hipocampus dos animais do grupo controle e grupo intoxicado, com uma quantidade reduzida de GSH no grupo intoxicado. Demonstrando que o MeHg promoveu uma produção de EROS supra-fisiológica, com conseqüente tentativa de compensação do organismo na busca de uma ação mais efetiva com aumento do consumo de GSH buscando uma inativação destas espécies reativas de oxigênio.

A depleção do antioxidante GSH exacerba a neurotoxicidade do glutamato. Sendo evidenciado na literatura, que na presença do MeHg a ativação dos receptores NMDA leva à geração de  $O_2^-$  e conseqüente morte celular (ASCHNER; SYVERSEN, 2005).

A partir disto, foi no presente estudo, feito a quantificação do glutamato e dos outros neurotransmissores presentes no tecido hipocampal dos animais submetidos a intoxicação por MeHg, os quais foram avaliados após 20 dias de exposição a altas doses do composto na água de beber. As dosagens de neurotransmissores, foram feitas a partir da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês (HPLC), como já mencionado posteriormente no tópico de materiais e métodos.

Quando quantificados os neurotransmissores da classe de catecolaminas, apenas dopamina demonstrou níveis presentes no tecido hipocampal passíveis de leitura, enquanto dos metabólitos, foi possível a mensuração apenas das quantidades de DOPAC.

No cérebro desenvolvido, a dopamina dentre outras ações, está relacionada a motivação, atenção, regulação de movimento e recompensa, o desbalanceamento desse neurotransmissor é relacionado a desordens neurológicas além de uma suscetibilidade a vícios (VALENZUELA; PH; MICHAEL, 2001).

Os níveis de dopamina (DA) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Quando comparados os níveis do metabólito DOPAC, foi observada uma diferença expressiva, sendo os níveis encontrados no grupo intoxicado por MeHg mais elevados que no grupo controle. O que indica uma alteração dopaminérgica pronunciada pela metabolização desbalanceada de DA, com conseqüente aumento de produção do metabólito primário DOPAC mas não do metabólito secundário HVA, o que pode indicar uma ação inibitória do MeHg sobre a enzima COMT, ou ainda um hiperestímulo, o que explicaria a não formação de HVA, pois para a formação deste é necessário que o DOPAC sofra uma metilação da COMT, porém a

síntese de DOPAC é catalisada pela oxidase MAO. Os metabólitos, assim como a DA se mostram alterados quando avaliados em tecidos cerebrais de camundongos e culturas de células neurais com respostas variáveis de acordo com a idade, dose, via de administração, tempo de exposição além da região cerebral avaliada (COCCINI et al., 2011). O motivo seria o fato de o MeHg promover, em células neurais, respostas inibitórias sobre os transportadores de dopamina (DAT), tanto em situações *in vitro* (SHAO; CHAN, 2015), quanto em situações *in vivo* (DREIEM et al., 2009; FARO et al., 2002). Além disso, uma vez que os receptores dopaminérgicos D2, D3 e D4, agem inibindo a adenilciclase por sua interação com a proteína Gi, pode haver uma possível ação do MeHg intensificando a ativação destes, o que seria um dos fatores de desbalanço na produção de AMPc.

No presente estudo, os níveis de tirosina no hipocampo nos animais do grupo controle e do grupo intoxicado não apresentaram diferença significativa, assim como os níveis de glicina, não representando no contexto do presente estudo, um papel crucial nas repercussões neurais do MeHg especificamente sobre o hipocampo, apesar de alterações sobre o metabolismo desses neurotransmissores em modelos *in vitro*, tendo o MeHg, quando administrado durante a diferenciação neuronal, promovido alterações epigenéticas sobre a produção de catecolaminas, principalmente supressão dos genes de tirosina hidroxilase (GO et al., 2018), e em culturas com células de tecido cerebral microvascular, o MeHg foi capaz de promover uma inibição da atividade enzimática da tirosina fosfatase 1B (YOSHIDA et al., 2017).

O glutamato, é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, assim como principal neurotransmissor presente nas sinapses hipocampais, por isso sendo um importante agente no aprendizado e fixação de memórias. Uma vez que o MeHg atinge as atividades no SNC, tendo como alvo principal os astrócitos e neurônios, há o desbalanceamento dos mecanismos homeostáticos, incluindo os estímulos excitatórios promovidos pela ligação do glutamato aos receptores NMDA, uma vez que esses estão hiperativados, acarretando assim, um excesso de glutamato na fenda sináptica, despolarização celular e uma sobrecarga de  $Ca^{2+}$  intracelular a partir da abertura de canais VOCCs, o que pode implicar em uma maior reatividade dos receptores V-GLUT, iniciando assim um ciclo de liberação desequilibrada de glutamato, formação de EROS como  $O_2^-$ , com conseqüente promoção da ativação de vias da MAPK, p38, caspase-3 e Bax/Bcl-2, por fim culminando na morte celular (ASCHNER; SYVERSEN, 2005; YANG et al., 2020).

No presente estudo, foi observado um aumento significativo quando comparados os níveis de glutamato dos grupos C e Hg, corroborando com os achados de Feng et al. (2017), em estudo no qual foi observado que o glutamato teve sua síntese elevada a partir da exposição ao MeHg administrado por via intraperitoneal por 4 semanas, induzindo uma queda de atividade da glutamina sintetase (GS), elevada atividade da glutaminase ativada por fosfato (GAT), gerando uma hiperexcitabilidade, que pode levar a um dano ou mesmo a morte celular, pelo aumento na produção de EROS citado posteriormente.

Além disso, foi observado um aumento significativo, quando avaliados os níveis do Neurotransmissor GABA, aminoácido com ação majoritariamente inibitória, no tecido hipocampal dos animais expostos a altas doses do MeHg em comparação com os animais do grupo controle.

Como visto por Minnema, Cooper e Greenland, (1989), a exposição ao MeHg é capaz de aumentar a liberação espontânea de GABA em sinaptossomos de cérebro de rato na ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular, além disso, o MeHg estimulou respostas nervosas de células tronco neurais humanas a partir de um aumento transitório da sensibilidade ou disponibilidade de GABA pós-sináptico.

Tendo em vista que os eventos celulares dependentes de GABA e dopamina são altamente sensíveis ao MeHg, principalmente os relacionados ao processamento de recompensa e em regiões corticais associadas a escolhas, principalmente no tecido neural em desenvolvimento, tendo efeitos sobre o SNC que persistem mesmo após a interrupção da exposição ao MeHg, tanto em questões neuropsicológicas quanto neuroquímicas (NEWLAND et al., 2006; NEWLAND; PALETZ; REED, 2008).

Podemos inferir que além de uma alteração nos níveis de GABA, e anteriormente citada, potencial desregulação no metabolismo dopaminérgico, também exista uma desregulação na sensibilidade à sinalização desses neurotransmissores, agindo principalmente a nível neuronal, uma vez que é nessas células que se encontra a maior concentração desse neurotransmissor.

Levando em conta os fatos anteriores e que os receptores gabaérgicos respondem à intoxicação mercurial de modo distinto a depender da célula que o receptor está localizado (YUAN; ATCHISON, 2003), é crucial entender a importância dessas informações a nível de intoxicação mercurial principalmente de populações ribeirinhas, cujos moradores sejam desde cedo, às vezes mesmo antes de nascer, expostos ao contato com o MeHg ou outra forma de Hg.

Sendo o GABA, um dos neurotransmissores mais importantes na consolidação da memória, como já citado, pois a partir do seu aumento, há uma redução da consolidação da memória, pela inibição dos neurônios presentes na via trisináptica hipocampal.

Um dos possíveis motivos do similar desbalanço sobre a homeostase dos aminoácidos GABA e glutamato, pode estar no fato de o MeHg ser um potencial agente desregulador do metabolismo da glutamina, que está diretamente envolvida tanto nos processos glutamatérgicos quanto gabaérgicos. O MeHg age sobre a enzima glutamina Sintetase (GS), alterando sua atividade com repercussões dependentes de dose e tempo em situações *in vitro* e dependente de idade, dose e tempo em situações *in vivo* (KWON; PARK, 2003; YIN et al., 2007).

No presente estudo foi observado uma maior quantidade de taurina no tecido hipocampal dos animais expostos ao MeHg, em comparação aos animais do grupo controle. A taurina é crucial em processos biológicos, como o desenvolvimento do sistema nervoso e em mecanismos imunológicos, aonde atua reduzindo o estresse oxidativo e com repercussão anti-inflamatória (SCHAFFER; LOMBARDINI; HUXTABLE, 1998).

O que indica uma síntese e liberação de taurina elevada a partir de um possível mecanismo antioxidante e anti-inflamatório na tentativa de diminuir o desbalanceamento sináptico, principalmente em uma “tentativa” de reduzir a hiperexcitabilidade promovida pela liberação de glutamato. Uma vez que a taurina sofre exocitose a partir de um acúmulo de íons  $K^+$  no meio extracelular e pode agir inibindo os disparos neuronais através da sua ligação a receptores de GABA e glicina (LEE et al., 2010; OJA; SARANSAARI, 2017; PEREIRA et al., 2013).

Alguns pontos se interligam quanto a ação do MeHg sobre as células neurais, como por exemplo, quantificação elevada nos níveis ou expressão de BDNF, pode significar uma reduzida plasticidade sináptica, uma vez que os potenciais de longa duração são prejudicados, há uma direta correlação com os neurotransmissores hipocampais, majoritariamente o glutamato, principal neurotransmissor desse mecanismo. Além disso, a presença de nitrito no tecido hipocampal, demonstra uma metabolização do NO, ou seja, outro agente crucial que atua como mensageiro retrogrado para sinalização de liberação do glutamato, Além de um possível gatilho para uma maior síntese de taurina por parte do organismo, visando uma resposta antioxidante (LEE et al., 2010; OJA; SARANSAARI, 2017).

Relatos na literatura têm indicado que os níveis de glutamato, GABA e taurina elevados, estão associados com o desbalanceamento nos níveis de GFAP, SNARES e outras proteínas cruciais para o mecanismo sinaptogênico, uma vez que alterações nessas moléculas podem indicar a ocorrência de eventos neuroinflamatórios e degenerativos como astrogliose reativa (JACOB; SUMATHI, 2019; LEE et al., 2010; OJA; SARANSAARI, 2017; PEREIRA et al., 2013).

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo, avaliou pela primeira vez o efeito do MeHg sobre os aminoácidos e monoaminas do hipocampo de camundongos jovens, além de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. Os resultados desse estudo podem contribuir para a melhor compreensão do impacto da intoxicação mercurial na saúde mental de indivíduos residentes em áreas de exposição endêmica. Mais estudos são necessários para discernir melhor os mecanismos envolvidos.

- A intoxicação mercurial na água de beber (20 mg / L) aumenta as concentrações de MeHg no pelo dos animais do grupo intoxicado, confirmando intoxicação crônica nos animais;
- Os camundongos expostos à intoxicação mercurial obtiveram um menor ganho de peso quando comparados ao grupo controle.
- Os níveis glutatona foram reduzidos e os níveis de malondialdeído aumentaram no hipocampo de camundongos C57BL6/J, após intoxicação mercurial, quando comparado as amostras de hipocampo do grupo controle, indicando um pronunciado aumento do estresse oxidativo.
- As concentrações da mieloperoxidase no hipocampo após intoxicação mercurial, aumentou no grupo MeHg, quando comparado as amostras de hipocampo do grupo controle, indicando uma resposta inflamatória.
- A intoxicação mercurial na água de beber (20 mg / L), não alterou os níveis de dopamina, porém causou um aumento nos níveis de DOPAC no hipocampo do grupo MeHg, quando comparado as amostras de hipocampo do grupo controle.
- Os níveis de aminoácidos como glutamato, taurina e GABA no hipocampo aumentou no grupo exposto à dose de 20 mg / L de MeHg na água de beber, quando comparado ao grupo controle. Não houve alteração no níveis glicina e tirosina entre os grupos.



## REFERÊNCIAS

- ABUHASAN, Q.; SIDDIQUI, W. **Neuroanatomy, Amygdala**. StatPearls Publishing, 2019.
- AHNERT-HILGER, G.; JAHN, R. CLC-3 splices up GABAergic synaptic vesicles. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 405–407, 2011.
- AKAGI, H.; MALM, O.; BRANCHES, F. J. P. Human exposure to mercury due to mining in the Amazon, Brasil- a review. **Environmental Science**, v. 3, p. 199–211, 1996.
- ALLEN, J. W.; MUTKUS, L. A.; ASCHNER, M. Methylmercury-mediated inhibition of 3H-D-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. **Brain Research**, v. 902, n. 1, p. 92–100, 2001.
- ALVES, J. C. et al. Risk estimation to human health caused by the mercury content of Sushi and Sashimi sold in Japanese restaurants in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 52, n. 6, p. 418–424, 3 jun. 2017.
- ANAND, K.; DHIKAV, V. Hippocampus in health and disease: An overview. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 15, n. 4, p. 239–246, out. 2012.
- ANDERSEN, A. et al. A neurological and neurophysiological study of chloralkali workers previously exposed to mercury vapour. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 88, n. 6, p. 427–433, 1 dez. 1993.
- ANDERSSON, H.; LINDQVIST, E.; OLSON, L. Downregulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in adult rat brain after acute administration of methylmercury. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 31, n. 3, p. 225–233, 1997.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p. 92–106, ago. 2010.
- ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Methylmercury: Recent Advances in the Understanding of its Neurotoxicity. **Physiology & behavior**, v. 27, n. 3, p. 278–283, 2005.
- ATTOFF, K. et al. Whole genome microarray analysis of neural progenitor C17.2 cells during differentiation and validation of 30 neural mRNA biomarkers for estimation of developmental neurotoxicity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.
- ATTWELL, D. Brain uptake of glutamate: Food for thought. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4 SUPPL., p. 1023–1025, 1 abr. 2000.
- AZEVEDO, J. S. et al. Total mercury in sediments and in Brazilian Ariidae catfish from two estuaries under different anthropogenic influence. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2724–2731, dez. 2011.

BAPTISTA, G. et al. Mercury, selenium and stable isotopes in four small cetaceans from the Southeastern Brazilian coast: Influence of feeding strategy. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1298–1307, 1 nov. 2016.

BARROS, L. L. S. **Efeitos da intoxicação mercurial no hipocampo e parâmetros lipídicos de camundongos submetidos à dieta ocidental**. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

BASTA, P. C.; HACON, S. DE S. Impacto do mercúrio na saúde do povo indígena munduruku, na bacia do tapajós. **WWF-Brasil; Fiocruz**. 2020. Disponível em: [https://www.greenpeace.org/static/planet4-brasil-stateless/9ec86ba8-wwfbr\\_2020\\_nt\\_impacto-mercúrio-saúde-povo-indígena-munduruku\\_v2.pdf](https://www.greenpeace.org/static/planet4-brasil-stateless/9ec86ba8-wwfbr_2020_nt_impacto-mercúrio-saúde-povo-indígena-munduruku_v2.pdf).

BERNTSSEN, M. H. G. et al. Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 83–97, 1 abr. 2004.

BERZAS NEVADO, J. J. et al. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review. **Environment International Elsevier Ltda**, ago. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412010000516>.

BHATIA, A.; SAADABADI, A. Biochemistry, Dopamine Receptors. **StatPearls Publishing**, 2019.

BIGHAM, G. N. et al. Biogeochemical controls on methylmercury in soils and sediments: Implications for site management. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, n. 2, p. 249–263, 1 mar. 2017.

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. **O comportamento do metilmercúrio (METILHg) no ambiente**. Química Nova. **Anais**. jul. 2004. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt).

BITENCOURT, P. E. R. et al. Exposição aguda ao Metilmercúrio em ratos em desenvolvimento: mini-revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. n. 2, p. 137–148, 2013.

BITTENCOURT, L. O. et al. Proteomic approach underlying the hippocampal neurodegeneration caused by low doses of methylmercury after long-term exposure in adult rats. **Metallomics**, v. 11, n. 2, p. 390–403, 1 fev. 2019.

BJØRKLUND, G. et al. Insights into the Potential Role of Mercury in Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2019.

BLOOM, N. S. On the Chemical Form of Mercury in Edible Fish and Marine Invertebrate Tissue. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 49, n. 5, p. 1010–1017, 1 maio 1992.

BOSE, R. et al. Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells. **Toxicological Sciences**, v. 130, n. 2, p. 383–390, dez. 2012.

BOTARO, D. et al. Mercury levels in feed and muscle of farmed tilapia. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 55, n. 12, p. 1159–1165, 1 dez. 2012.

**BRASIL**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 222, de 28 de março de 2018**. Diário Oficial da União, 2018. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3427425/RDC\\_222\\_2018\\_.pdf/c5d3081d-b331-4626-8448-c9aa426ec410](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3427425/RDC_222_2018_.pdf/c5d3081d-b331-4626-8448-c9aa426ec410). Acesso em: 12 nov. 2020

**BRASIL**. **Segurança Química - Mercúrio**. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/perguntasfrequent.html?view=faq&catid=28>.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. The aging kidney and the nephrotoxic effects of mercury. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 20, n. 2, p. 55–80, 17 fev. 2017.

BRIONI, J. D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Development Research**, v. 28, n. 1, p. 3–27, 1 jan. 1993.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Glutamate: A truly functional amino acid. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 413–418, 18 set. 2013.

BURKE, W. J. et al. Neurotoxicity of MAO Metabolites of Catecholamine Neurotransmitters: Role in Neurodegenerative Diseases. **NeuroToxicology**, v. 25, n. 1–2, p. 101–115, 2004.

CARRASCO, L. et al. Patterns of mercury and methylmercury bioaccumulation in fish species downstream of a long-term mercury-contaminated site in the lower Ebro River (NE Spain). **Chemosphere**, v. 84, p. 1642–1649, 2011.

CASTOLDI, A. F. et al. Neurodevelopmental toxicity of methylmercury: Laboratory animal data and their contribution to human risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, jul. 2008.

CECCATELLI, S.; ASCHNER, M. **Current Topics in Neurotoxicity 2**. 2012.

CHANG, J. W. et al. Dendritic translocation of RC3/neurogranin mRNA in normal aging, Alzheimer disease and fronto-temporal dementia. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 56, n. 10, p. 1105–1118, 1997.

CHANG, J. W. et al. Cognitive function and blood methylmercury in adults living near a deserted chloralkali factory. **Environmental Research**, v. 108, n. 3, p. 334–339, nov. 2008.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Dopaminergic neurons. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 5 SPEC. ISS., p. 942–946, maio 2005.

CIRANNA, L. Serotonin as a Modulator of Glutamate- and GABA-Mediated Neurotransmission: Implications in Physiological Functions and in Pathology. **Current Neuropharmacology**, v. 4, n. 2, p. 101–114, 28 mar. 2006.

COCCINI, T. et al. Developmental exposure to methylmercury and 2,2',4,4',5, 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) affects cerebral dopamine D1-like and D2-like receptors of weanling and pubertal rats. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 10, p. 1281–1294, 18 out. 2011.

CONDINI, M. V. et al. Mercury concentrations in dusky grouper *Epinephelus marginatus* in littoral and neritic habitats along the Southern Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 115, n. 1–2, p. 266–272, 15 fev. 2017.

CRUZ, F. V. DA S. et al. Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, n. October 2019, p. 110021, 2020.

CRUZAT, V. et al. **Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation** Nutrients MDPI AG, , 1 nov. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30360490/>. Acesso em: 24 nov. 2020

DA ROSA QUINTANA, G. C.; MIRLEAN, N. Record of Hg pollution around outset of colonization in Southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 4, 1 abr. 2019.

DAUGHERTY, A. M. et al. Age differences in hippocampal subfield volumes from childhood to late adulthood. **Hippocampus**, v. 26, n. 2, p. 220–228, 1 fev. 2016.

DE ALMEIDA RODRIGUES, P. et al. Seasonal influences on swimming crab mercury levels in an eutrophic estuary located in southeastern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 3, p. 3473–3482, 1 jan. 2020.

DE CARVALHO, G. G. A. et al. Assessment of total and organic mercury levels in blue sharks (*Prionace glauca*) from the south and southeastern Brazilian coast. **Biological Trace Element Research**, v. 159, n. 1–3, p. 128–134, 2014.

DE FREITAS, C. M. et al. From samarco in mariana to vale in Brumadinho: Mining dam disasters and public health. **Cadernos de Saude Publica**, v. 35, n. 5, 2019.

DE LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: Uma análise das áreas críticas. **Estudos Avancados**, v. 22, n. 63, p. 173–190, 2008.

DE OLIVEIRA SANTOS, E. C. et al. Exposure to mercury in the urban population of Rio Branco City, State of Acre, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 3, p. 314–319, 1 set. 2002.

DE PAIVA, E. L.; MORGANO, M. A.; MILANI, R. F. Cadmium, lead, tin, total mercury, and methylmercury in canned tuna commercialised in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 10, n. 3, p. 185–191, 3 jul. 2017.

DÍEZ-GUERRA, F. J. Neurogranin, a link between calcium/calmodulin and protein kinase C signaling in synaptic plasticity. **IUBMB Life**, v. 62, n. 8, p. 597–606, 21 jul. 2010.

DOI, R. Individual Difference of Methylmercury Metabolism in Animals and Its Significance in Methylmercury Toxicity. In: **Advances in Mercury Toxicology**. [s.l.] Springer US, 1991. p. 77–98.

DOS SANTOS, A. A. et al. Oxidative stress in methylmercury-induced cell toxicity. **Toxics**, v. 6, n. 3, p. 1–15, 2018.

DREIEM, A. et al. Methylmercury inhibits dopaminergic function in rat pup synaptosomes in an age-dependent manner. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 31, n. 5, p. 312–317, set. 2009.

EDOFF, K. et al. Gestational Age and Sex Influence the Susceptibility of Human Neural Progenitor Cells to Low Levels of MeHg. **Neurotoxicity Research**, v. 32, n. 4, p. 683–693, 1 nov. 2017.

EPA, U. Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation. Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry Engineering and Analysis Division (4303) Science And Technology. **Method 1630**. 1998.

ESTEVES, G. DE F. et al. Do tailings from the Mariana, MG (Brazil), disaster affect the initial development of millet, maize, and sorghum? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 38662–38673, 2020.

ETO, K. [Minamata disease: a neuropathological viewpoint]. **Seishin shinkeigaku zasshi = Psychiatria et neurologia Japonica**, v. 108, n. 1, p. 10–23, 2006.

FARINA, M.; ASCHNER, M. Glutathione antioxidant system and methylmercury- induced neurotoxicity: An intriguing interplay. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1863, n. 12, p. 129285, 2019.

FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. **Mechanisms of methylmercury- induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies**. Life Sciences. **Anais...Elsevier Inc.**, 10 out. 2011. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3183295/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3183295/). Acesso em: 12 nov. 2020

FARO, L. R. F. et al. Protection of methylmercury effects on the in vivo dopamine release by NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 5, p. 612–618, 2002.

FEITOSA-SANTANA, C. et al. Color vision impairment with low-level methylmercury exposure of an Amazonian population – Brazil. **NeuroToxicology**, v. 66, p. 179–184, 2018.

FENG, S. et al. Sulforaphane Prevents Methylmercury-Induced Oxidative Damage and Excitotoxicity Through Activation of the Nrf2-ARE Pathway. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 375–391, 1 jan. 2017.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 449–457, 15 ago. 2009.

FUJIMURA, M.; USUKI, F. Site-specific neural hyperactivity via the activation of MAPK and PKA/CREB pathways triggers neuronal degeneration in methylmercury-intoxicated mice. **Toxicology Letters**, v. 271, p. 66–73, 5 abr. 2017.

GENOVESE, T. et al. Hypericum perforatum attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Shock**, v. 25, n. 2, p. 161–167, fev. 2006.

GO, S. et al. Methylmercury causes epigenetic suppression of the tyrosine hydroxylase gene in an in vitro neuronal differentiation model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 4, p. 435–441, 25 ago. 2018.

GOMES, R. A. **Atividade de glutathione peroxidase e relação de glutathione reduzida/glutathione oxidada como biomarcadores de estresse oxidante em mudilídeos**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2006.

GREENPIECE. **Avaliação dos riscos em saúde da população afetada pelo desastre de Mariana**. 2017.

GROTTO, D. et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo-malondialdeído. **Quim. Nova**, v. 31, n. 2, p. 275–279, 2008.

HATJE, V. et al. Historical records of mercury deposition in dated sediment cores reveal the impacts of the legacy and present-day human activities in Todos os Santos Bay, Northeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 145, p. 396–406, 1 ago. 2019.

HEIMFARTH, L. et al. Developmental neurotoxicity of the hippocampus following in utero exposure to methylmercury: impairment in cell signaling. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 513–527, 2018.

HERB, A. et al. Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 8, n. 5, p. 367–374, 1 jan. 1997.

HONG, Y. S.; KIM, Y. M.; LEE, K. E. Methylmercury exposure and health effects. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 45, n. 6, p. 353–363, nov. 2012.

HUANG, Z. J.; PAUL, A. The diversity of GABAergic neurons and neural communication elements. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 563–572, 1 set. 2019.

IEF. **Instituto Estadual de Florestas - IEF - NOTA DE ESCLARECIMENTO 12 - DESASTRE BARRAGEM B1**. 2019. Disponível em:

<http://www.ief.mg.gov.br/noticias/2587-nota-de-esclarecimento-12-desastre-barragem-bl>. Acesso em: 11 nov. 2020.

JACOB, S.; SUMATHI, T. Extenuation of in utero toxic effects of MeHg in the developing neurons by Fisetin via modulating the expression of synaptic transmission and plasticity regulators in hippocampus of the rat offspring. **Chemico-Biological Interactions**, v. 305, p. 3–10, 25 maio 2019.

JACOB, S.; THANGARAJAN, S. Fisetin impedes developmental methylmercury neurotoxicity via downregulating apoptotic signalling pathway and upregulating Rho GTPase signalling pathway in hippocampus of F1 generation rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 88–96, 1 out. 2018.

JAKARIA, M. et al. Taurine and its analogs in neurological disorders: Focus on therapeutic potential and molecular mechanisms. **Redox Biology**, v. 24, 1 jun. 2019.

JÚNIOR, L. R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112–119, jan. 2001.

KASPER, D. et al. Reservoir stratification affects methylmercury levels in river water, plankton, and fish downstream from Balbina hydroelectric dam, Amazonas, Brazil. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 1032–1040, 21 jan. 2014.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 4, p. 492–500, jul. 2006.

KEHRIG, H. A. et al. Selenium and mercury in widely consumed seafood from South Atlantic Ocean. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 156–162, 1 jul. 2013.

KENTROS, C. G. et al. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. **Neuron**, v. 42, n. 2, p. 283–295, 2004.

KERSHAW, T. G.; DHAHIR, P. H.; CLARKSON, T. W. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. **Archives of Environmental Health**, v. 35, n. 1, p. 28–36, 1980.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, maio 2005.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Current Biology**, v. 25, n. 23, p. R1116–R1121, 7 dez. 2015.

KRICHMAR, J. L. et al. Characterizing functional hippocampal pathways in a brain-based device as it solves a spatial memory task. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 6, p. 2111–2116, 8 fev. 2005.

LEOCÁDIO, P. C. L. et al. Pollutants and nutrition: Are methylmercury effects on blood pressure and lipoprotein profile comparable to high-fat diet in mice? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, 1 nov. 2020.

LANSENS, P. et al. Determination of methylmercury in natural waters by headspace gas chromatography with microwave-induced plasma detection after preconcentration on a resin containing dithiocarbamate groups. **Analytica Chimica Acta**, v. 234, n. C, p. 417–424, 1990.

LÁZARO, W. L. et al. Cyanobacteria enhance methylmercury production: A hypothesis tested in the periphyton of two lakes in the Pantanal floodplain, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 456–457, p. 231–238, 2013.

LEÃO, L. K. R. et al. *Mauritia flexuosa* L. protects against deficits in memory acquisition and oxidative stress in rat hippocampus induced by methylmercury exposure. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 297–304, 28 maio 2017.

LEE, S. H. et al. The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 16796–16808, 15 dez. 2010.

LIN, X. et al. Acute oral methylmercury exposure perturbs the gut microbiome and alters gut-brain axis related metabolites in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, n. December 2019, p. 110130, 2020.

LISMAN, J. E.; GRACE, A. A. The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron**, v. 46, n. 5, p. 703–713, 2005.

LU, X. et al. Methylmercury uptake and degradation by methanotrophs. **Science Advances**, v. 3, n. 5, p. e1700041, 1 maio 2017.

MAHER, P. et al. The role of Ca<sup>2+</sup> in cell death caused by oxidative glutamate toxicity and ferroptosis Cell Calcium. **Elsevier Ltda**, 1 mar. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014341601730074X>. Acesso em: 24 nov. 2020

MAIA, C. DO S. F. **Efeitos do etanol e/ou metilmercúrio no Desenvolvimento do sistema nervoso central: alterações morfológicas e comportamentais em ratos adultos**. 2009. 97f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MASCARENHAS, A. F. S. et al. Avaliação da concentração de mercúrio em sedimentos e material particulado no rio Acre, estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 61–68, 2004.

MCNAMARA, C. G. et al. Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and



spatial memory persistence. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 1658–1660, 2014.

MICARONI, R. C. DA C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. DE F. Compostos de Mercúrio. Revisão de Métodos de Determinação, Tratamento e Descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487–495, 2000.

MINNEMA, D. J.; COOPER, G. P.; GREENLAND, R. D. Effects of methylmercury on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 99, n. 3, p. 510–521, jul. 1989.

MOSQUERA-GUERRA, F. et al. Mercury in Populations of River Dolphins of the Amazon and Orinoco Basins. **EcoHealth**, v. 16, n. 4, p. 743–758, 2019.

MÜNSTER-WANDOWSKI, A.; GÓMEZ-LIRA, G.; GUTIÉRREZ, R. Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. NOV, p. 1–19, 22 nov. 2013.

NEUNER-JEHLE, M. et al. Characterization and sleep deprivation-induced expression modulation of dendrin, a novel dendritic protein in rat brain neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 46, n. 2, p. 138–151, 1996.

NEWLAND, M. C. et al. Developmental Behavioral Toxicity of Methylmercury: Consequences, Conditioning, and Cortex. In: **Animal Models of Cognitive Impairment**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2006.

NEWLAND, M. C.; PALETZ, E. M.; REED, M. N. Methylmercury and nutrition: Adult effects of fetal exposure in experimental models. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 5, p. 783–801, 1 set. 2008.

NISSINEN, E.; MÄNNISTÖ, P. T. Biochemistry and pharmacology of catechol-O-methyltransferase inhibitors. In: **International Review of Neurobiology**. Academic Press Inc., 2010. v. 95p. 73–118.

OJA, S. S.; SARANSAARI, P. Significance of taurine in the brain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 975, p. 89–94, 2017.

OLSEN, R. W.; DELOREY, T. M. **GABA Receptor Physiology and Pharmacology**. Lippincott-Raven, 2015.

PACYNA, E. G. et al. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. **Atmospheric Environment**, v. 44, n. 20, p. 2487–2499, jun. 2010.

PARK, Y. et al. Exposure to lead and mercury through breastfeeding during the first month of life: A CHECK cohort study. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 876–883, 15 jan. 2018.

PEREIRA, C. et al. The redox interplay between nitrite and nitric oxide: From the gut to the

brain. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 276–284, 1 jan. 2013.

PINTO, D. V. **Papel do metilmercúrio no estresse oxidativo no hipocampo, cerebelo e fígado e alterações metabólicas em camundongos c57bl/6j lactentes**. 2018. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

RADONJIC, M. et al. Delay and impairment in brain development and function in rat offspring after maternal exposure to methylmercury. **Toxicological Sciences**, v. 133, n. 1, p. 112–124, maio 2013.

RANDALL SLEMMON, J.; FENG, B.; ERHARDT, J. A. Small proteins that modulate calmodulin-dependent signal transduction: Effects of pep- 19, neuromodulin, and neurogranin on enzyme activation and cellular homeostasis. **Molecular Neurobiology**, v. 22, n. 1–3, p. 99–113, 2001.

RIZZINI ANSARI, N. et al. Assessing mercury contamination in a tropical coastal system using the mussel *Perna perna* and the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 12, p. 679, 18 dez. 2016.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: Da pesquisa à prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 1, p. e12–e19, jul. 2008.

ROOS, D. H. et al. Complex methylmercury-cysteine alters mercury accumulation in different tissues of mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 4, p. 789–792, 2010.

ROOS, D. H. et al. Modulation of methylmercury uptake by methionine: Prevention of mitochondrial dysfunction in rat liver slices by a mimicry mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 252, n. 1, p. 28–35, 2011.

ROSEN, Z. B.; CHEUNG, S.; SIEGELBAUM, S. A. Midbrain dopamine neurons bidirectionally regulate CA3-CA1 synaptic drive. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 12, p. 1763–1771, 2015.

ROTH, F. C.; DRAGUHN, A. GABA metabolism and transport: Effects on synaptic efficacy. **Neural Plasticity**, v. 2012, 2012.

RUSH, T. et al. Glutathione-mediated neuroprotection against methylmercury neurotoxicity in cortical culture is dependent on MRP1. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 476–481, 20 jun. 2012.

SARAFIAN, T. A. et al. bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. **Toxicology Letters**, v. 74, n. 2, p. 149–155, nov. 1994.

SCHAFFER, S.; LOMBARDINI, J. B.; HUXTABLE, R. J. **Taurine 3**. v. 442

SCHEEFHALS, N.; MACGILLAVRY, H. D. Functional organization of postsynaptic glutamate receptors Molecular and Cellular Neuroscience. **Academic Press Inc.**, 1 set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29777761/>. Acesso em: 24 nov. 2020

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. C, p. 192–205, 1 out. 1968.

SHAO, Y.; CHAN, H. M. Effects of methylmercury on dopamine release in MN9D neuronal cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 8, p. 637–644, 2015.

SPURNY, B. et al. Hippocampal GABA levels correlate with retrieval performance in an associative learning paradigm. **NeuroImage**, v. 204, p. 116244, 1 jan. 2020.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 4, p. 215–226, out. 2012.

TAUPIN, P. **The Hippocampus Neurotransmission and Plasticity in the Nervous System**. 2017.

THOMPSON, F. et al. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135914, 25 fev. 2020.

TINÔCO, A. A. P. et al. Evaluation of mercury contamination in Descoberto, MG. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 15, n. 4, p. 305–314, 2010.

TOMIYASU, T. et al. Mercury contamination in the Yatsushiro Sea, south-western Japan: Spatial variations of mercury in sediment. **Science of the Total Environment**, v. 257, n. 2–3, p. 121–132, 10 ago. 2000.

URBAN-CIECKO, J.; BARTH, A. L. Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 401–409, 1 jul. 2016.

VALENZUELA, C. F.; PH, D.; MICHAEL, P. Update on Brain Pathology Focus on: Neurotransmitter Systems. **Alcohol Research & Health**, volume 34, issue number1, v. 32, 2001.

VAN KESTEREN, R. E.; SPENCER, G. E. The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation. **Reviews in the Neurosciences**, v. 14, n. 3, p. 217–231, 2003.

VÁZQUEZ, M.; DEVESA, V.; VÉLEZ, D. Characterization of the intestinal absorption of inorganic mercury in Caco-2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 93–102, 2014.

VERGILIO, C. DOS S. et al. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

WALKER, M. C.; VAN DER DONK, W. A. The many roles of glutamate in metabolism *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **Springer Verlag**, 1 mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26323613/>. Acesso em: 24 nov. 2020

WHO. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. **World Health Organization**, Geneva, 2003.

WINNER, C. How Does Toxic Mercury Get into Fish?. **Oceanus Magazine**. 2010. Disponível em: <https://www.whoi.edu/oceanus/feature/how-does-toxic-mercury-get-into-fish/>. Acesso em: 12 nov. 2020.

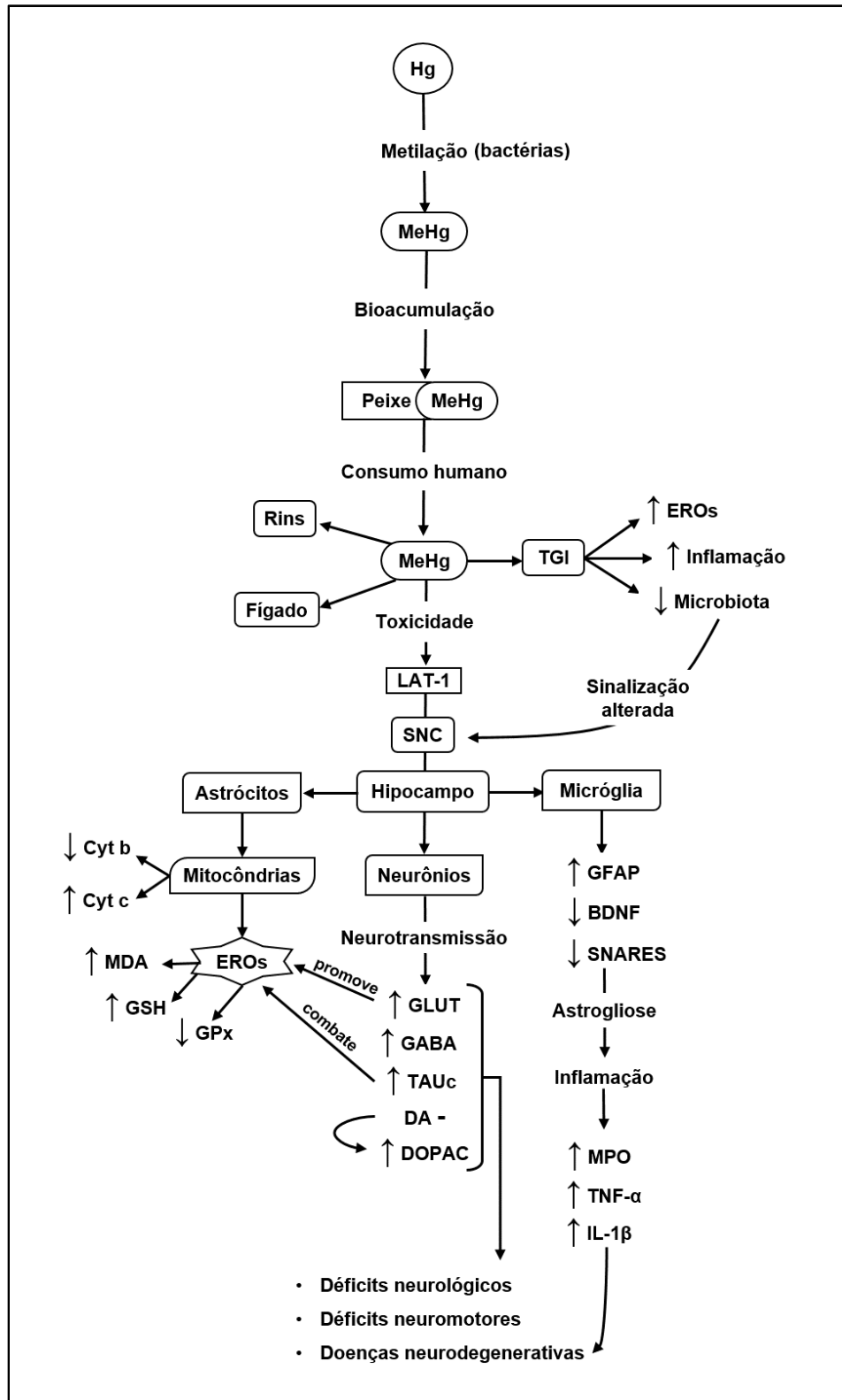
YANG, T. et al. Oxidative stress accelerates synaptic glutamate dyshomeostasis and NMDARs disorder during methylmercury-induced neuronal apoptosis in rat cerebral cortex. **Environmental Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 683–696, 1 jun. 2020.

YIN, Z. et al. The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 4, p. 1083–1090, 2008.

YOSHIDA, E. et al. Methylmercury promotes prostacyclin release from cultured human brain microvascular endothelial cells via induction of cyclooxygenase-2 through activation of the EGFR-p38 MAPK pathway by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B activity. **Toxicology**, v. 392, p. 40–46, 1 dez. 2017.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Methylmercury differentially affects GABA<sub>A</sub> receptor-mediated spontaneous IPSCs in Purkinje and granule cells of rat cerebellar slices. **Journal of Physiology**, v. 550, n. 1, p. 191–204, 1 jul. 2003

## APÊNDICE A – MAPA CONCEITUAL SOBRE A CONTAMINAÇÃO POR METILMERCÚRIO



**ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**

FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ  
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA  
ENSINANDO E APRENDENDO

UNIVERSIDADE DE FORTALEZA  
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Comissão de Ética no Uso de Animais– CEUA

**PARECER N.º. 015/2015**

**Projeto de Pesquisa:** Integração da pesquisa em neurociência e bioquímica para redução do impacto da Hiperlipidemia e intoxicação mercurial no desenvolvimento infantil.

**Pesquisador Responsável:** Ramon da Silva Raposo

**Finalidade de Proposta:** Pesquisa

**Data de apresentação ao CEUA:** 17/04/15

**Registro no CEUA:** 15-006

**Tipo de Animal:** Roedores

**Espécie:** Camundongo Heterogênico

**Linhagem:** C57BL6J

**Quantidade:** 80 (80 machos)

**Idade e Peso:** 28 dias / 8 a 11 gramas

**Vigência da autorização:** 01/07/16 a 01/07/17

**Parecer:** Aprovado na data de 19/06/16

---

**Prof. Saulo Ellery Santos**  
Coordenador Adjunto da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA